



Ana Mafalda Silva Oliveira

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

**Aplicação das Técnicas de Espectroscopia
 μ -Raman e MEV na Análise da Interface
Adesiva entre o Substrato Dentinário e o
Material Restaurador**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Alda Sofia Pessanha de Sousa Moreno,
Professora Auxiliar Convidada, Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Ana Filipa Marques Chasqueira, Assistente
Convidada, Faculdade de Medicina Dentária da Universidade
Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Célia Maria Reis Henriques
Arguente: Prof. Doutor Jaime Pereira Fontes de Almeida Portugal
Vogal: Prof. Doutora Alda Sofia Pessanha de Sousa Moreno

Aplicação das Técnicas de Espetroscopia μ -Raman e MEV na Análise da Interface Adesiva entre o Substrato Dentinário e o Material Restaurador

Copyright © Ana Mafalda Silva Oliveira, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicado aos meus avós, Manuel, Ana, Joaquim, Teresa e à minha madrinha, Paula.

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.

Ricardo Reis, in "Odes"
Heterónimo de Fernando Pessoa

Agradecimentos

Quero dar os meus sinceros agradecimentos à Professora Doutora Alda Sofia Pessanha de Sousa Moreno, orientadora do projeto, e à Dra. Ana Filipa Marques Chasqueira, co-orientadora, pelo apoio e disponibilidade dedicados, por todo o conhecimento partilhado e pela incansável e constante simpatia demonstrada que tanto as caracteriza. Uma referência também à Professora Doutora Sofia Oliveira, da FMDUL, pelas “pequenas” mas essenciais ajudas facultadas.

Um agradecimento a todos os outros professores que cruzaram o meu percurso e que, inevitavelmente, me ajudaram a crescer tanto profissional como pessoalmente.

Um agradecimento muito especial a toda a minha família, especialmente aos meus pais, António e Paula, por sempre acreditarem em mim e nas minhas capacidades e por serem uma fonte constante de incentivo e apoio, sem dúvida, os meus melhores pilares; à minha irmã Bárbara, a melhor amiga que os meus pais me deram e ao meu namorado, João Nuno, por estar sempre presente.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a todos os meus amigos, especialmente, ao Leo, ao Neto, à Rita, à Gabi, à Mimi, à Sara, à Mariana, à Pipas e à Nocas, que, cada um à sua maneira, tornaram-se nos “amigos da faculdade que são para a vida” e ao meu grande amigo de infância, Costinha, pelo incansável apoio dedicado na finalização deste projeto; muito obrigada pelo apoio incondicional e por terem sido os fiéis companheiros nesta caminhada.

A todas estas pessoas, sem dúvida, que as palavras não descrevem o quão grata lhes estou.

Resumo

A cárie dentária é uma das doenças mais prevalentes na população mundial sendo o seu tratamento um dos procedimentos mais comuns em Medicina Dentária. Atualmente, o material restaurador mais utilizado é uma resina composta que, pela sua viscosidade, não possibilita a adesão direta à estrutura dentária e, por isso, é imperativa a utilização de um sistema adesivo intermediário. O procedimento envolvido neste tipo de restaurações é tecnicamente muito sensível e a durabilidade da interface criada pelo sistema adesivo entre a resina composta e o dente continua a ser foco de estudo na dentisteria.

O objetivo da presente investigação centra-se no estudo da interface adesiva criada entre dois tipos de substrato dentinário (são e afetado) e o material restaurador por intermédio de um sistema adesivo universal (Futurabond M+), segundo as suas duas estratégias de aplicação (*etch-and-rinse* – ER e *self-etch* – SE). Para tal, pretendem-se avaliar os graus de conversão (DC) do sistema adesivo e de desmineralização (DD) da dentina, com recurso à Espectroscopia de μ -Raman, e a qualidade da interface adesiva através de Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV). As análises foram realizadas em espécimes 24 horas após o procedimento restaurador e, noutros, após 6 meses.

Os resultados indicaram diferenças na interface adesiva criada entre os dois tipos de substrato dentinário e o material restaurador tendo sido estas estatisticamente significativas ($p < 0,004$) nos espécimes de substrato afetado com 6 M de envelhecimento, após o procedimento restaurador. Quanto aos valores médios obtidos para o DD, verificaram-se valores superiores associados à estratégia ER; os valores médios para o DC foram elevados ($DC \geq 78\%$) e transversais ao tipo de substrato dentinário, estratégia de aplicação do sistema adesivo e período de envelhecimento, tendo-se medido valores mais baixos perto da dentina e mais altos junto do sistema adesivo. As imagens obtidas por MEV foram coerentes com os resultados obtidos pela técnica de Espectroscopia μ -Raman.

Palavras-chave: dentisteria; dentina afetada; grau de conversão; grau de desmineralização; Espectroscopia μ -Raman; MEV.

Abstract

Caries are one of the most prevalent diseases in the world population being their restoration one of the most common procedures in Dentistry. Nowadays, the material most often used for this purpose is a resin composite that due to its viscosity cannot adhere directly to the tooth and an intermediate adhesive system is mandatory. The restorative procedure is technically very sensitive and the durability of the interface created by the adhesive between the composite and the tooth substrate remains focus of study.

The purpose of this project is to study the adhesive interface created between two types of dentin (sound and affected) and the restorative material by a universal adhesive system (Futurabond M+), according to its two application approaches (etch-and-rinse - ER and self-etch - SE). To fulfil this purpose, we intend to evaluate the degree of conversion (DC) of the adhesive system and the degree of demineralization (DD) of the dentin, using μ -Raman Spectroscopy, and the quality of the adhesive interface by Scanning Electron Microscopy (SEM). Analyses were performed in specimens 24 hours after the restorative procedure and, in others, 6 months later.

The results showed differences in the adhesive interface created between the two types of dentin and the restorative material having been statistically significant ($p < 0.004$) in the affected substrate specimens with 6 months aging, after the restorative procedure. The average values obtained for DD associated with the ER approach were, in overall, higher; the average values obtained for DC were high ($DC \geq 78\%$) and transverse to the type of dentin, the adhesive system application approach and aging periods, having been measured lower values close to the dentin and higher close to the adhesive system. SEM images were consistent with the results obtained by the μ -Raman Spectroscopy technique.

Keywords: dentistry; caries affected dentin; degree of conversion; degree of demineralization; μ -Raman spectroscopy; SEM.

Índice de Conteúdos

Agradecimentos	ix
Resumo	xi
Abstract	xiii
Índice de Conteúdos	xv
Índice de Figuras	xix
Índice de Tabelas.....	xxiii
Abreviaturas, Acrónimos, Siglas e Símbolos.....	xxv
1. Introdução.....	1
1.1 Contextualização no âmbito da Engenharia Biomédica.....	2
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Gerais	3
1.2.2 Específicos	3
2. A Adesão Dentária	5
2.1 O Dente	5
2.1.1 Constituição do Dente	5
2.1.2 Dentina.....	6
2.1.2.1 Composição e Formação.....	6
2.1.2.2 Classificação	8
2.1.2.3 Propriedades Físicas e Mecânicas	9
2.1.3 Dentina com Lesão de Cárie	9
2.2 Preparo Cavitário e <i>Smear Layer</i>	10
2.2.1 Vantagens e Desvantagens	10
2.3 Sistemas Adesivos Dentários	10
2.3.1 Classificação e Composição	11
2.3.1.1 Estratégia <i>Etch-and-Rinse</i>	11
2.3.1.2 Estratégia <i>Self-Etch</i>	12
2.3.2 Limitações ao uso de Sistemas Adesivos Dentários.....	15
2.4 Resinas Compostas	15

3. Estado da Arte	17
4. Técnicas Analíticas.....	21
4.1 Espetroscopia Micro-Raman	21
4.1.1 O Princípio Físico – Descrição do Efeito de Raman	21
4.1.2 Vibrações Moleculares.....	23
4.1.3 Instrumentação	24
4.1.4 Vantagens e Limitações da Técnica	24
4.2 Microscopia Eletrónica de Varrimento	25
4.2.1 O Princípio Físico – Interação do Feixe Eletrónico com a Matéria	25
4.2.2 Princípio de Funcionamento – Construção da Imagem.....	26
4.2.2.1 Imagem formada/obtida por Eletrões Secundários	26
4.2.3 Vantagens e Limitações da Técnica	27
5. Materiais e Métodos.....	29
5.1 Seleção dos Dentes.....	29
5.2 Sistema Adesivo Universal, Resina Composta e Ácido	29
5.3 Preparação dos Espécimes.....	30
5.3.1 Corte	30
5.3.2 Procedimento Restaurador	32
5.4 Grau de Conversão e Grau de Desmineralização	33
5.4.1 Preparação dos Espécimes para Análise Espetoscópica (μ -Raman)	34
5.4.2 <i>Setup</i> Experimental μ -Raman Confocal.....	34
5.5 Imagens obtidas por Microscopia Eletrónica de Varrimento	36
5.5.1 Protocolo de Preparação dos Espécimes	36
5.5.2 <i>Setup</i> Experimental.....	38
5.6 Análise Estatística	39
5.6.1 Teste <i>U</i> de Mann-Whitney	39
5.6.1.1 Hipóteses de Estudo.....	40
6. Análise e Discussão de Resultados	43
7. Considerações Finais e Perspetivas Futuras.....	51
8. Publicações	53
9. Referências Bibliográficas	55
Anexo I.....	63

Anexo II.....	65
Anexo III	67
Anexo IV	69
Anexo V.....	77
Anexo VI	79

Índice de Figuras

Figura 2. 1 – Imagem ilustrativa da anatomia do dente (adaptado de [18]).....	6
Figuras 2. 2 – Imagens obtidas por MEV de A) dentina desmineralizada evidenciando a sua estrutura tubular (a imagem não está à escala) [14] e B) exposição da rede de colagénio à volta dos túbulos dentinários (TD) [28]. Destaque para as dentinas intertubular (Int) e peritubular (Per).	7
Figura 2. 3 – Imagem obtida por MEV evidenciando a <i>smear layer</i> (SL) e <i>smear plug</i> (SP) – no túbulo dentinário (TD) (adaptado de [39]).....	10
Figura 2. 4 – Ilustração do procedimento restaurador segundo a estratégia ER, acompanhada de imagens representativas obtidas por MEV (as imagens não estão à escala) (A – Adesivo, CH – camada, R – resina composta restauradora) (adaptado de [28]).	12
Figura 2. 5 – Ilustração do procedimento restaurador segundo a estratégia SE, acompanhada de imagens representativas obtidas por MEV (as imagens não estão à escala) (A – Adesivo, CH – camada híbrida com manutenção da <i>smear layer</i> , Pr – <i>primer</i> ácido, R – resina composta restauradora, SP – <i>smear plug</i>) (adaptado de [28]).	13
Figura 4. 1 – Diagrama de níveis de energia com discriminação das transições espectroscópicas envolvidas no sinal Raman (adaptado de [58]).	22
Figura 4. 2 – Ilustração dos tipos de vibrações moleculares: <i>stretching</i> e/ou <i>bending or deformation</i> (adaptado de [60]).	23
Figura 4. 3 – Esquema representativo do volume de interação dos eletrões na amostra (forma em gota) e origem de alguns sinais (adaptado de [67]).	26
Figuras 5. 1 – Fotografias dos materiais utilizados no procedimento restaurador. A) ácido ortofosfórico Vococid; B) resina composta Tetric EvoFlow; C) sistema adesivo universal Futurabond M+).	30
Figura 5. 2 – Esquema representativo do corte de um dente molar. Remoção das partes oclusal (O) e radicular (R), dando origem a uma fatia transversal em relação ao longo eixo do dente tendo esta sido cortada ao meio a fim de se obterem duas hemi-fatias.....	31
Figuras 5. 3 – Fotografias de A) máquina de corte (Buehler, IsoMet1000 Precision Saw), Lab Biomateriais, FMDUL; B) simulação da <i>smear layer</i> através do polimento com uma lixa de SiC de grão 320.	31
Figuras 5. 4 – Fotografias das hemi-fatias obtidas após o procedimento restaurador A) em substrato dentinário são; B) em substrato dentinário afetado (D – dentina, R – resina composta restauradora).	32
Figura 5. 5 – Representação espectral do sistema adesivo universal (Futurabond M+) e dos principais monómeros constituintes (Bis-GMA e HEMA) e respetiva caracterização das bandas das ligações aromática ($\sim 1610\text{ cm}^{-1}$) e alifática ($\sim 1640\text{ cm}^{-1}$) (adaptado de [19]).....	34
Figura 5. 6 – Fotografia do espectrómetro confocal μ -Raman XploRA (Horiba/ Jobin-Yvon Xplora, França), Lab 120 DF FCT-UNL.	35

Figura 5. 7 – Imagem de microscópio ótico (100x) com identificação de uma linha de aquisição ao longo da interface adesiva (IA) entre a dentina (D), visualmente identificável pelos túbulos dentinários (TD), e o material restaurador – resina composta (R) (26 espectros com um <i>step</i> de 1 μm).	36
Figura 5. 8 – Fotografia do material usado no polimento dos espécimes para análise MEV. Sequência de lixas de granulometria 800, 1500 e 2500 sob refrigeração (1), seguido do polimento com pastas de diamante policristalinas de granulometria 3, 1 e 0,25 μm (2, 3 e 4, respectivamente), em panos de feltro para polimento.....	37
Figura 5. 9 – Fotografias de A) equipamento de metalização Jeol JFC-1100E Ion Sputtering Device (Jeol, Tóquio, Japão), Lab UICOB, FMDUL; B) espécimes acoplados a um <i>stub</i> após metalização.....	38
Figuras 5. 10 - Fotografias do Microscópio Eletrônico de Varrimento Hitachi S-450 (Tóquio, Japão), Lab Biomateriais, FMDUL.	39
Figura 6. 1 – Comparação em <i>waterfall</i> dos espectros obtidos na zona da camada híbrida para o grupo SER-24, com identificação das bandas de interesse: $\sim 960\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1610\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$	44
Figura 6. 2 – Comparação em <i>waterfall</i> dos espectros obtidos na zona da camada híbrida para o grupo SSE-24.....	44
Figura 6. 3 – Comparação em <i>waterfall</i> dos espectros obtidos na zona da camada híbrida para o grupo AER-24.	45
Figura 6. 4 – Comparação em <i>waterfall</i> dos espectros obtidos na zona da camada híbrida para o grupo ASE-24.....	45
Figuras 6. 5 – Imagens obtidas por MEV (2000x) da interface adesiva formada nos grupos SER-24 e SSE-24) (CH – camada híbrida, D – dentina (desmineralizada), PR – prolongamento resinoso).....	46
Figuras 6. 6 – Imagens obtidas por MEV (2000x) da interface adesiva formada nos grupos AER-24 e ASE-24 (CH – camada híbrida, D – dentina (desmineralizada), R – resina composta, A – adesivo, PR – prolongamento resinoso).....	47
Figura 6. 7 - Imagem obtida por MEV (2000x) da interface adesiva formada no grupo SER-6). Observação de um <i>gap</i> na restauração e consequente exposição dos túbulos dentinários não impregnados pelo sistema adesivo (D – dentina (desmineralizada), R – resina composta, A – adesivo, PR – prolongamento resinoso).	48
Figura A.II. 1 – Protocolo de aplicação do sistema adesivo universal Futurabond M+ segundo as instruções do fabricante.....	65
Figuras A.II. 2 – Fotografias tiradas aquando do procedimento experimental: A) aplicação do ácido fosfórico Vococid, no caso da estratégia ER; B) aplicação do sistema adesivo universal Futurabond M+; C) polimerização por ativação com fonte luminosa (400-500nm); D) restauração com resina composta Tetric EvoFlow e finalização com repetição do passo de polimerização.....	66
Figura A.III. 1 – Comparação em <i>waterfall</i> dos espectros obtidos na zona da camada híbrida para o grupo SER-6.....	67

Figura A.III. 2 – Comparação em <i>waterfall</i> dos espectros obtidos na zona da camada híbrida para o grupo SSE-6.	67
Figura A.III. 3 – Comparação em <i>waterfall</i> dos espectros obtidos na zona da camada híbrida para o grupo AER-6.	68
Figura A.III. 4 – Comparação em <i>waterfall</i> dos espectros obtidos na zona da camada híbrida para o grupo ASE-6.	68
Figuras A.IV. 1 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo SER-24 com ampliações a) 500x, b) 1000x, c) 5000x.	69
Figuras A.IV. 2 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo SSE-24 com ampliações a) 500x, b) 1000x, c) 5000x.	70
Figuras A.IV. 3 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo AER-24 com ampliações a) 500x, b) 1000x, c) 5000x.	71
Figuras A.IV. 4 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo ASE-24 com ampliações a) 500x, b) 1000x, c) 5000x.	72
Figuras A.IV. 5 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo SER-6 com ampliações a) 500x, b) 1000x.	73
Figuras A.IV. 6 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo SER-6, mas num espécime diferente do anterior, com ampliações a) 500x, b) 1000x.	73
Figuras A.IV. 7 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo SSE-6 com ampliações a) 500x, b) 1000x, c) 2000x, d) 5000x.	74
Figuras A.IV. 8 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo AER-6 com ampliações a) 500x, b) 1000x, c) 2000x, d) 5000x.	75
Figuras A.IV. 9 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo ASE-6 com ampliações a) 500x, b) 1000x, c) 2000x, d) 5000x.	76

Índice de Tabelas

Tabela 2. 1 – Classificação e caracterização das duas estratégias de aplicação dos sistemas adesivos (<i>ER</i> e <i>SE</i>) [8].	14
Tabela 5. 1 - Nomenclatura adotada para identificação dos grupos em estudo.....	32
Tabela A.I. 1 – Componentes e composição (%) do sistema adesivo universal Futurabond M+ e da resina composta Tetric EvoFlow utilizados no presente estudo.	63
Tabela A.V. 1 – Tabela do <i>output</i> obtido para o teste <i>U</i> de Mann-Whitney: estatísticas de teste para as variáveis <i>DC</i> e <i>DD</i> , face à variável de agrupamento “estratégia”	77
Tabela A.V.2 – Tabela do <i>output</i> obtido para o teste <i>U</i> de Mann-Whitney: estatísticas descritivas para as variáveis <i>DC</i> e <i>DD</i>	78
Tabela A.VI. 1 – Tabela com os valores obtidos para o grau de conversão [<i>DC</i> (%)] na camada híbrida, em dentinas sã e afetada, face às estratégias de aplicação do sistema adesivo (<i>ER</i> e <i>SE</i>), 24 h após o procedimento restaurador.....	79
Tabela A.VI. 2 – Tabela com os valores obtidos para o grau de desmineralização [<i>DD</i> (%)] desde o início da camada híbrida até ao fim da região desmineralizada pelo ácido, em dentinas sã e afetada, face às estratégias de aplicação do sistema adesivo (<i>ER</i> e <i>SE</i>), 24 h após o procedimento restaurador (CH identificada a sombreado).....	80
Tabela A.VI.3 – Tabela com os valores obtidos para o grau de conversão [<i>DC</i> (%)] na camada híbrida, em dentinas sã e afetada, face às estratégias de aplicação do sistema adesivo (<i>ER</i> e <i>SE</i>), 6 M após o procedimento restaurador.....	81
Tabela A.VI.4 – Tabela com os valores obtidos para o grau de desmineralização [<i>DD</i> (%)] desde o início da camada híbrida até ao fim da região desmineralizada pelo ácido, em dentinas sã e afetada, face às estratégias de aplicação do sistema adesivo (<i>ER</i> e <i>SE</i>), 6 M após o procedimento restaurador (CH identificada a sombreado).....	82

Abreviaturas, Acrónimos, Siglas e Símbolos

α	Tensor de polarizabilidade molecular
δ	Coeficiente de emissão de elétrons secundários
γ -MPTS	γ -metacriloxipropiltrimetoxisilano
λ	Livre percurso médio
μ -Raman	Micro-Raman
4-MET	4-metacriloxietiltrimetílico
10-MDP	10-monodihidrogenofosfato
Al	Alumínio
Bis-EMA	Bisfenol-A-glicidiletoxiladodimetacrilato
Bis-GMA	Bisfenol-A-glicidilmetacrilato
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatite
Ca	Cálcio
CCD	Do inglês <i>Charge Coupled Devices</i>
CH	Camada híbrida
Cu	Cobre
DC	Do inglês <i>Degree of Conversion</i>
DD	Do inglês <i>Degree of Demineralization</i>
E	Amplitude da componente elétrica da radiação
ER	Do inglês <i>Etch-and-Rinse</i>
ES	Elétrons Secundários
F	Fluor
FCT-UNL	Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
Fe	Ferro
fenil-P	2-metacriloxietil fenil hidrogenofosfato

FMDUL	Faculdade de Medicina Dentários da Universidade de Lisboa
GPDM	Ácido glicerofosfóricodimetacrilato
HCl	Ácido hidrocloreídrico
HEMA	2-hidroxietilmetacrilato
HMDS	Hexametildisilazano
<i>I</i>_{desmineralizado}	Intensidade da banda de fosfato em cada espectro
<i>i</i>_{EP}	Quantidade de eletrões incidentes/primários
<i>i</i>_{ES}	Quantidade de eletrões secundários ejetados da amostra
<i>I</i>_{mineralizado}	Intensidade da banda de fosfato no máximo de mineralização do substrato
<i>I</i>_r	Intensidade das bandas reativas que identificam as duplas ligações
<i>I</i>_{ref}	Intensidade das bandas de referência que identificam as duplas ligações
JAD	Junção amelodentinária
M	Meses (dependendo do contexto)
MEV	Microscopia Eletrónica de Varrimento
Mg	Magnésio
MMPs	Metaloproteínases da matriz
<i>n</i>	Adesivo não-polimerizado
Na	Sódio
NPG-GMA	N-fenilglicina e glicidil-metacrilato
<i>p</i>	Momento dipolar induzido
P	Fósforo
<i>Pe</i>	Probabilidade de escape dos eletrões secundários
PO_4^{3-}	Fosfato
<i>pol</i>	Adesivo polimerizado
<i>q</i>	Vibração molecular
SE	Do inglês <i>Self-Etch</i>

SiC	Carbeto de silício
Sr	Estrôncio
TEGDMA	Trietilenoglicoldimetacrilato
u.a.	Unidades arbitrárias
UDMA	Uretanodimetacrilato
UICOB	Unidade de Investigação em Ciências Orais e Biomédicas
ν_0	Frequência de vibração da radiação incidente
ν_{vib}	Frequência de vibração
z	Profundidade onde foi gerado o elétron secundário
Zn	Zinco

1. Introdução

A cárie dentária é uma patologia de origem bacteriana, muito prevalente na população mundial, que conduz à destruição parcial ou total do dente [1]. Paralelamente, tem-se verificado uma crescente preocupação relacionada com a estética dentária, pois os dentes constituem uma peça fundamental na aparência individual [2]. O tratamento de dentes cariados é realizado através da remoção do tecido infetado e posterior restauração com materiais que substituem a estrutura dentária perdida. Atualmente, o material mais utilizado para esse fim é de natureza polimérica, mais concretamente uma resina composta [1][3]. Uma vez que, pela sua viscosidade e hidrofobia, este material não tem a capacidade de adesão direta à estrutura dentária, torna-se imperativa a utilização de um sistema adesivo que, por um lado, infiltre a estrutura dentária promovendo microretenção mecânica e, por outro, copolimerize com o material restaurador suprajacente, aquando da ativação da reação de polimerização [3].

Genericamente, existem dois tipos de sistemas adesivos: os *etch-and-rinse* – ER – (de condicionamento independente) e *self-etch* – SE – (autocondicionantes). Recentemente surgiram sistemas adesivos universais passíveis de serem aplicados segundo ambas as estratégias. Segundo a estratégia ER, o substrato é condicionado com um ácido, normalmente ácido ortofosfórico 35-37%, previamente à aplicação do sistema adesivo propriamente dito. Este ácido promove a remoção do componente mineral do substrato para posterior impregnação do sistema adesivo nos espaços criados; ao passo que, segundo a estratégia SE, a desmineralização ocorre em simultâneo com a penetração do sistema adesivo, uma vez que não existe um condicionamento independente, sendo o componente ácido parte constituinte do sistema adesivo [3][4].

A restauração com uma resina composta é um procedimento tecnicamente muito sensível. Também a durabilidade e a estabilidade da interface criada pelo adesivo, entre a resina composta e o dente, continua a ser objeto de estudo frequente na investigação em Medicina Dentária. Sabe-se que ao longo do tempo é frequente ocorrer degradação da interface, com possível desenvolvimento de cárie secundária e consequente falha da restauração [3]. Uma forma de avaliar a qualidade da interface é através do seu grau de conversão – DC^1 – que representa a quantidade de monómero que se liga em cadeia aquando da polimerização (conversão de ligação $C=C$ para ligação $C-C$). A existência de

¹ Do inglês *Degree of Conversion*

monômero livre pós-polimerização pode conduzir à sua eluição com consequente prejuízo das propriedades mecânicas, físicas e químicas da interface adesiva. Assim, quanto maior o valor de DC , maior a estabilidade dessa interface e, consequentemente, da restauração no seu todo [5][6]. Por outro lado, o grau de desmineralização – DD^2 – torna possível avaliar a profundidade da desmineralização e a capacidade de impregnação do sistema adesivo através da dentina [7].

A adesão em Medicina Dentária pode ser realizada sobre vários substratos, mas o esmalte e a dentina são os mais frequentemente envolvidos [8]. Num cenário clínico, o tratamento da cárie dentinária consiste na remoção da dentina infetada, normalmente com meios mecânicos, resultando numa cavidade onde muitas vezes a base é dentina afetada, com características morfológicas, químicas e físicas diferentes da dentina sã [9].

Este trabalho revela-se importante e inovador no sentido em que vem aprofundar os estudos de Espetroscopia μ -Raman no processo de adesão dentinária, vem validar a metodologia em tecido dentinário afetado e testa um sistema adesivo universal recente (Futurabond M+, Voco, Cuxhaven, Alemanha), que poderá vir a simplificar o procedimento de adesão à estrutura dentinária. Deste modo, recorrendo às técnicas de Espetroscopia μ -Raman e Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV), a presente investigação pretende analisar a qualidade da interface entre a dentina e o material restaurador através da determinação do DC , do DD da dentina e da análise ultramorfológica dessa interface.

1.1 Contextualização no âmbito da Engenharia Biomédica

A Engenharia Biomédica é uma área polivalente capaz de aplicar princípios relacionados com os campos da ciência, da engenharia e da tecnologia a fim de analisar e resolver problemas centrados na área da medicina [10][11].

Tendo em conta a epidemiologia da cárie dentária e a sua restauração, torna-se fundamental que se desenvolvam sistemas adesivos cada vez mais simples e rápidos de usar, mas ao mesmo tempo, com bom desempenho clínico ao longo do tempo [8]. No presente trabalho de investigação, tomando partido das informações obtidas com as técnicas analíticas de Espetroscopia μ -Raman e de MEV pretende-se avaliar, *in vitro*, o desempenho de um sistema adesivo utilizado frequentemente na restauração de dentes cariados. Neste sentido, o cruzamento dos conhecimentos da Engenharia Biomédica com a Medicina Dentária manifesta-se ser uma mais valia para ambas as áreas.

² Do inglês *Degree of Demineralization*

1.2 Objetivos

1.2.1 Gerais

O objetivo principal do presente trabalho de investigação é o estudo da interface adesiva criada entre dois tipos de substrato dentinário e o material restaurador por intermédio de um sistema adesivo universal segundo as suas duas estratégias de aplicação. Para tal, pretende-se avaliar a qualidade da interface dentina-adesivo através do grau de conversão (*DC*) do sistema adesivo ao longo da interface e do grau de desmineralização (*DD*) da dentina, com recurso à técnica de Espetroscopia μ -Raman. É também objetivo do trabalho analisar a morfologia das interfaces adesivas através da interpretação das imagens obtidas por MEV.

1.2.2 Específicos

1. Determinar os *DC* e *DD* de forma a avaliar a qualidade da adesão;
2. Fazer o tratamento estatístico dos resultados e inferir possíveis implicações dos resultados do ponto de vista clínico;

2. A Adesão Dentária

2.1 O Dente

A dentição humana definitiva é composta por trinta e dois dentes, distribuídos igualmente por duas arcadas (superior/maxilar e inferior/mandíbula) e quatro quadrantes. Cada quadrante é constituído por três dentes molares (primeiro, segundo e terceiro), dois pré-molares (primeiro e segundo), um canino e dois incisivos (central e lateral) [12][13].

2.1.1 Constituição do Dente

Anatomicamente, cada dente é composto por duas partes distintas: a coroa e a raiz. A primeira é constituída por esmalte (mais externamente), dentina coronária e polpa (no centro), ao passo que a segunda é constituída por cemento (mais externamente), dentina radicular e polpa radicular (Figura 2. 1). O esmalte representa o tecido mais mineralizado e duro do corpo humano com mais de 96% de matéria inorgânica sob a forma de cristais de hidroxiapatite, que constituem uma estrutura com um grande número de unidades prismáticas complexamente organizada [12]. A dentina é um tecido histologicamente mais complexo que o esmalte, de estrutura tubular (túbulos dentinários), e constitui a maior parte da estrutura dentária, desempenhando um papel fulcral na proteção da polpa e sustentação do esmalte [14]. A polpa é formada por tecido conjuntivo altamente vascularizado e innervado que nutre a dentina, concede-lhe sensibilidade e possui a capacidade de produzir novo tecido dentinário. Na zona mais periférica da polpa encontram-se os odontoblastos (células responsáveis pela síntese da dentina) e os seus prolongamentos avançam pelo interior dos túbulos dentinários. A dentina e a polpa, por se encontrarem intimamente relacionadas topográfica, embriológica e funcionalmente, constituem o complexo dentino-pulpar. Finalmente, o cemento, juntamente com o ligamento periodontal, o osso alveolar e a gengiva compõem o periodonto, que confere sustentação e proteção ao dente [15][16][13].

Os dentes estão implantados na margem dos ossos do maxilar e da mandíbula, em cavidades ósseas denominadas de alvéolos. A fixação da raiz do dente no osso alveolar é mediada por fibras de colagénio que constituem o ligamento periodontal [17][13].

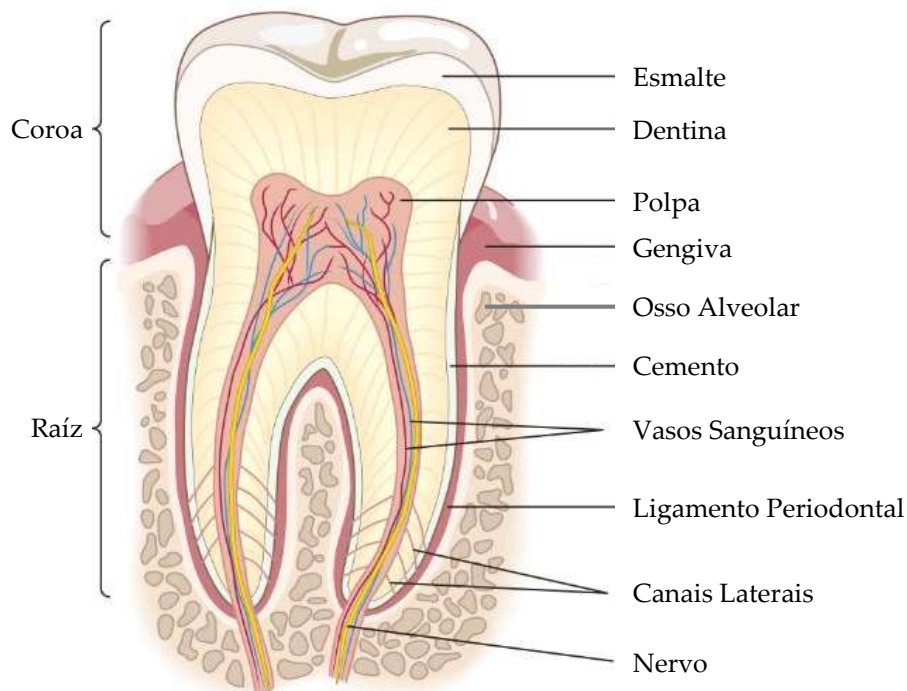


Figura 2. 1 – Imagem ilustrativa da anatomia do dente (adaptado de [18]).

2.1.2 Dentina

2.1.2.1 Composição e Formação

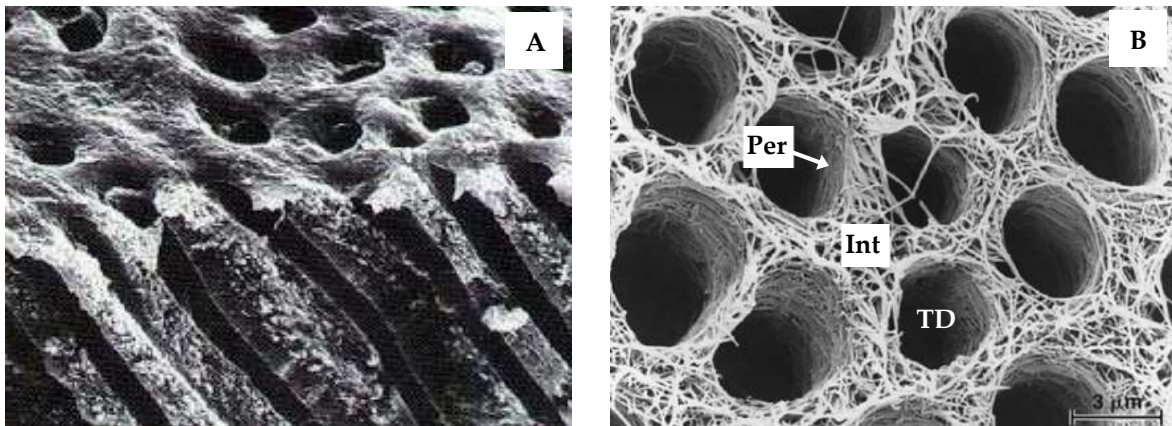
A dentina é um tecido conjuntivo avascular especializado e mineralizado que compreende cerca de 45-50% de componente mineral, 30% de componente orgânico, sobretudo fibras de colagénio do tipo I (e em muito menor quantidade tipo III e V) e 20-25% de água [14][16][19]. A porção mineralizada (inorgânica) é composta por fosfato de cálcio – apatite carbonatada na dentina natural – e contém quantidades vestigiais de outros fosfatos, sulfatos e elementos como Na, Sr, Al, F, Cu, Zn, Fe e Mg [20]. O fosfato de cálcio apresenta-se na forma de complexos cristais de hidroxiapatite – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ [12]. Nesta composição também estão incluídas proteínas não-colagénicas (proteínas ácidas e proteínas séricas), proteoglicanos, glicoproteínas, fosfoproteínas, proteínas morfogenéticas dentinárias e alguns componentes lipídicos que, para além de preencherem os espaços existentes entre as fibras de colagénio, vão se acumulando na periferia dos túbulos dentinários [16][21].

Os túbulos dentinários são estruturas cónicas e ramificadas, sendo que a ramificação mais pronunciada ocorre próxima da junção amelodentinária (JAD)³ e, contrariamente, apresentam um diâmetro maior e estão mais intimamente relacionados próximos da polpa

³ Interface entre o esmalte e a dentina

[4][16][22]. Cada túbulo dentinário está circunscrito por uma dentina hipermineralizada, denominada dentina peritubular e, entre estes, encontra-se a dentina intertubular, rica em matéria orgânica e menos calcificada que a dentina peritubular [23][24]. Os túbulos dentinários formam uma rede que permite a difusão de nutrientes e fluido pela dentina (Figuras 2. 2) [16].

Desde a fase de desenvolvimento até à maturação, a dentina está sujeita a alterações tanto na sua composição orgânica como inorgânica. O grau de mineralização do dente é um processo contínuo e pode ocorrer fisiologicamente com a idade do indivíduo, ou patologicamente como resposta à lesão de cárie e a procedimentos operatórios e restauradores [14]. A dentinogénese⁴ é realizada pelos odontoblastos, células especializadas que se diferenciam a partir de células ectomesenquimatosas da papila dentária⁵, que se dispõem ao longo da interface polpa-dentina e cujos prolongamentos citoplasmáticos penetram no interior do tecido formado [16][25][26]. Neste processo distinguem-se duas etapas: o desenvolvimento inicial da matriz orgânica da dentina (pré-dentina) e a sua maturação (mineralização) [14]. Os odontoblastos controlam a síntese de pré-dentina, que consiste numa camada de matriz não mineralizada de dentina, formada imediatamente a seguir ao tecido pulpar [16][21]. Estes sintetizam e secretam uma rede tridimensional de fibras de colagénio (tipo I) e sobre esta depositam outras proteínas (osteopontina, osteonectina, osteocalcina e proteínas morfogenéticas) que exercem atração para o mineral de hidróxiapatite [27]. À medida que as fibras de colagénio são mineralizadas, a pré-dentina dá origem à dentina e uma nova camada de pré-dentina começa a formar-se em redor da polpa [16].



Figuras 2. 2 – Imagens obtidas por MEV de A) dentina desmineralizada evidenciando a sua estrutura tubular (a imagem não está à escala) [14] e B) exposição da rede de colagénio à volta dos túbulos dentinários (TD) [28]. Destaque para as dentinas intertubular (Int) e peritubular (Per).

⁴ Processo de formação da dentina

⁵ Tecido responsável pela formação da dentina, cemento e polpa

2.1.2.2 Classificação

A dentina, quanto ao seu desenvolvimento, pode ser classificada em dentina primária, secundária ou terciária.

A **dentina primária**, tal como o nome indica, é a original e é maioritariamente formada antes da erupção do dente [29]. Dentro desta, é possível distinguir a primeira camada de dentina a ser formada, a dentina do manto, que é produzida pelos odontoblastos em diferenciação, e situa-se próximo da JAD; e a dentina circumpulpar que, delinea a câmara pulpar e constitui o resto da dentina primária, que por sua vez pode ser dividida em dentina intertubular e dentina peritubular [16][30]. A dentina primária caracteriza-se por ter um padrão regular e estrutura tubular [25].

A **dentina secundária** define-se por se desenvolver depois da erupção do dente, ainda que mais lentamente que a dentina primária, em resposta aos estímulos de baixa intensidade decorrentes da função biológica normal [16][25]. Esta dentina representa a função secretora pós-desenvolvimento dos odontoblastos primários e é formada ao longo das paredes de dentina circumpulpar. Os túbulos dentinários sofrem uma mudança de direção na região onde termina a dentina primária e começa a secundária, podendo esta ser distinguida histologicamente da primária por uma linha de demarcação subtil ao apresentar túbulos dentinários em menor quantidade e organização [25][29].

A **dentina terciária**, também conhecida como dentina de substituição ou reparadora, é assim nomeada por ser produzida em reação a estímulos nocivos, como cárie e processos de restauração, com o intuito de criar uma barreira protetora para o complexo pulpo-dentinário [16][25][29]. Ao contrário das dentinas primária e secundária, a terciária não se desenvolve circumpulparmente, mas apenas no local afetado pelos estímulos [16]. Dentro desta distinguem-se a dentina reacional, produzida por odontoblastos primários que sobreviveram ao estímulo nocivo; e dentina reparadora, produzida por uma nova geração de odontoblastos após a morte dos primários. Nesta dentina, os túbulos dentinários revelam-se mais irregulares, em número reduzidos ou mesmo ausentes, dando origem, neste caso, a uma matriz atubular distrófica com células aprisionadas no seu interior [16][25]. Este acontecimento deve-se ao facto de ocorrer morte dos odontoblastos ou interferência metabólica tanto nas células sobreviventes como nas recém-formadas [29].

Para além destas, a **dentina esclerótica** também é referida na literatura e, à semelhança da dentina terciária, surge como um mecanismo de defesa, em resposta a estímulos lentos mas cumulativos. Neste caso, ocorre obliteração dos túbulos dentinários e, portanto, a permeabilidade deste substrato diminui [4][25]. Devido ao seu elevado grau de esclerose tubular e conteúdo mineral, a dentina esclerótica apresenta maior dureza que as dentinas primária e secundária. As características mencionadas conferem uma aparência transparente a este tipo de dentina [4].

2.1.1.2.3 Propriedades Físicas e Mecânicas

A dentina é uma estrutura branco-amarelada e é a principal responsável pela coloração do dente. Dada a translucidez e reduzida espessura do esmalte, a luz atravessa-o facilmente e é refletida pela dentina subjacente, dando origem à aparência amarelada da coroa do dente. Este tom varia com a idade e de um indivíduo para outro [16]. A dentina, apesar de ser um tecido duro, apresenta simultaneamente viscoelasticidade e flexibilidade, de forma a prevenir a fratura do esmalte [16][25]. Assim, caracteriza-se por apresentar uma dureza de 4 na escala de Mohs [31], 93 de dureza Knoop [32] e 57-60 de dureza Vickers [33]. Tem um módulo de Young de 18 GPa [34] e um índice de refração de 1,49 [35]. Este tecido, à parte do esclerótico, revela-se permeável dada a quantidade de túbulos dentinários que o atravessam [4].

2.1.3 Dentina com Lesão de Cárie

O processo de lesão de cárie consiste num conjunto de episódios dinâmicos e cíclicos de desmineralização e remineralização dos tecidos duros do dente provocados pela ação de bactérias cariogénicas (*Streptococcus mutans* - início do desenvolvimento; alguns *Lactobacillus* - desenvolvimento tardio; alguns *Actinomyces* - cárie radicular), que decompõem os hidratos de carbono dos alimentos ingeridos, originando ácidos que provocam a dissolução do conteúdo mineral do dente, conduzindo à perda parcial ou total do dente [1][9][36][37].

A dentina com lesão de cárie engloba duas camadas distintas: uma camada de dentina infetada e, subjacente a esta, uma de dentina afetada. A dentina infetada caracteriza-se por ser altamente desmineralizada, fisiologicamente não-remineralizável e apresenta as suas proteínas colagénicas desnaturadas. Por outro lado, a camada mais interior não se encontra infetada por bactérias, apresenta desmineralização parcial e, uma vez que é considerada fisiologicamente remineralizável, a sua conservação durante o processo de restauração do dente é de elevada importância. Desta forma, o tratamento da lesão de cárie consiste na remoção da dentina infetada e necrótica, resultando numa cavidade cuja base é frequentemente constituída por dentina afetada que, ainda assim, possui características morfológicas, químicas e físicas diferentes da dentina sã [9].

No tocante à componente inorgânica existe um decréscimo relativo ao conteúdo de Ca e P, bem como de Mg, sendo que o decréscimo deste último representa o primeiro sinal de desmineralização e pode indicar perda da matriz de dentina peritubular. Os cristais de apatite apresentam as características dos formados na dentina terciária. No que respeita à componente orgânica, as ligações covalentes do colagénio sofrem alterações, resultando num menor número destas [9].

O volume perdido devido à desmineralização da dentina é repostado por água, sendo que este conteúdo pode ser até 40% superior em dentina afetada relativamente à sã. Por outro lado, a permeabilidade da dentina afetada diminui em resposta à obliteração dos túbulos

dentinários. A dentina afetada, apesar da relativa esclerose tubular, apresenta menor dureza que a dentina sã e o módulo de Young da dentina intertubular decresce em, aproximadamente, 12% nos túbulos obliterados [4][9].

Estes fatores irão, provavelmente, influenciar a eficácia do sistema adesivo no processo de restauração [2][4][9].

2.2 Preparo Cavitário e *Smear Layer*

A expressão *smear layer* diz respeito à camada de detritos originada pela instrumentação dos tecidos dentários durante a remoção do tecido cariado e o preparo cavitário, sendo composta por resíduos orgânicos e inorgânicos de dentina, bactérias, saliva e sangue. Esta prolonga-se pela entrada dos túbulos dentinários formando estruturas designadas por *smear plugs* (Figura 2. 3) [14][20][38].

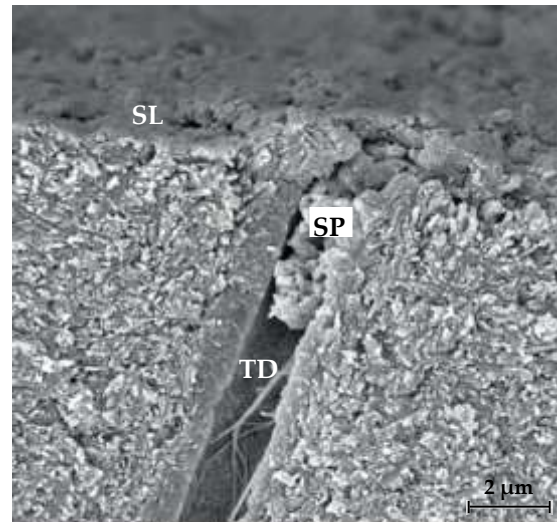


Figura 2. 3 – Imagem obtida por MEV evidenciando a *smear layer* (SL) e *smear plug* (SP) – no túbulo dentinário (TD) (adaptado de [39]).

2.2.1 Vantagens e Desvantagens

Esta camada apresenta como vantagem o facto de reduzir a permeabilidade dentinária e, consequentemente, a difusão de fluidos orais e produtos tóxicos até à polpa, por microinfiltração marginal. Assim, ao preservar a *smear layer*, previne-se a penetração bacteriana. Contrariamente, ao removê-la, a permeabilidade dentinária aumenta, condicionando um elevado grau de humidade na superfície exposta, resultante da exsudação de fluido dentinário a partir dos túbulos o que, por sua vez, pode favorecer a degradação das interfaces adesivas das restaurações já que esses materiais são muito sensíveis à presença da água [4][14].

2.3 Sistemas Adesivos Dentários

Um dos maiores avanços na Medicina Dentária foi a descoberta e desenvolvimento de adesivos dentários, onde o esmalte e a dentina representam os principais substratos envolvidos [8].

O mecanismo básico de adesão assenta num processo de substituição dos minerais removidos dos tecidos dentários por monómeros dos sistemas adesivos [8]. Os sistemas adesivos dentários consistem numa combinação de monómeros resinosos hidrofílicos e hidrofóbicos, de diferentes pesos moleculares, e solventes que após polimerizarem *in situ*, estabelecem uma ligação entre o substrato (húmido) e o material restaurador (hidrofóbico) [5][40]. Assim, os monómeros ficam micromecanicamente retidos nas porosidades criadas, dando origem à formação de uma camada híbrida (CH)⁶ constituída por uma rede de fibras de colagénio impregnada pelos monómeros de resina e cristais residuais de hidroxiapatite [8][40][41].

Desde a introdução da técnica do condicionamento ácido por Buonocore (1955) que a adesão ao esmalte é obtida com sucesso, todavia, a adesão à dentina tem-se revelado menos consistente e previsível [42]. Esta capacidade de adesão potencialmente menos eficaz à dentina é justificada pela complexidade histológica que lhe é inerente. Dado o exposto, o desenvolvimento de sistemas adesivos dentinários tem-se revelado um longo processo no sentido de garantir uma boa retenção destes, bem como um selamento da interface resina/dentina, que seja o mais hermético possível, com o objetivo de aumentar a longevidade desta interface e, consequentemente, da restauração [8].

A classificação atual dos sistemas adesivos divide-os em dois grupos, baseada na forma como estes interagem com o substrato - *etch-and-rinse* - ER (removem a *smear layer*) e *self-etch* - SE (modificam a *smear layer* e incorporam-na na formação da CH) [38].

2.3.1 Classificação e Composição

2.3.1.1 Estratégia Etch-and-Rinse

A estratégia ER faz uso de um passo isolado de condicionamento ácido da superfície da dentina (ácido ortofosfórico – pH 0,1-0,4), com o objetivo de remover completamente a *smear layer*, abrindo os túbulos dentinários, desmineralizando a superfície peritubular e intertubular da dentina e expondo a rede de colagénio praticamente desprovida de hidroxiapatite [4][8][43]. Assim, são criadas porosidades nanométricas nesta rede, que permitem a infiltração de comonomeros solvatados, constituindo uma estrutura-base para uma melhor retenção da resina, aplicada posteriormente [43].

Após o condicionamento ácido, procede-se à sua eliminação por lavagem com água, de forma a remover os sais dissolvidos de fosfato de cálcio. A concentração do ácido fosfórico entre os 35-37% garante as condições ideais para a obtenção de um substrato recetivo aos procedimentos restauradores subsequentes, pois conduz à formação de um precipitado solúvel em água e, por isso, facilmente eliminado durante a sua lavagem [4]. Um jato de ar suave é aplicado de forma a remover o excesso de água, resultando num substrato húmido

⁶ Recentemente também designada por interface adesiva

e sem colapso da rede de colagénio. Uma vez concluídos os passos anteriores, fica exposta uma rede hidratada de colagénio no interior da qual são dispersos os monómeros hidrofílicos, permitindo a hibridização da resina composta nas paredes laterais dos túbulos dentinários (Figura 2. 4). Esta hibridização contribui para a adesão e permite a selagem potencialmente hermética desses túbulos, tal qual existia originalmente antes da remoção do esmalte, impedindo o acesso à polpa de bactérias, toxinas ou outros produtos [4][8].

Segundo esta estratégia, verifica-se frequentemente uma incompleta infiltração da dentina pela resina adesiva, face à profundidade de desmineralização deste substrato resultante do condicionamento ácido. Esta discrepância torna-se bastante vulnerável ao fenómeno de nanoinfiltração que pode comprometer a longevidade das restaurações [4].

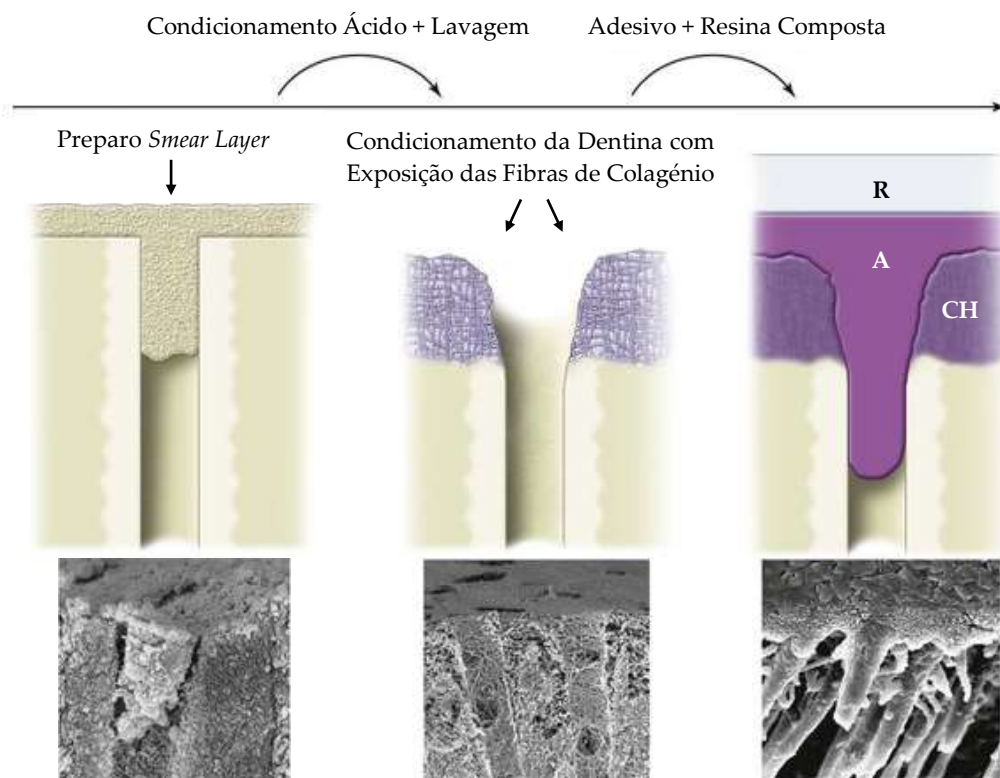


Figura 2. 4 – Ilustração do procedimento restaurador segundo a estratégia *ER*, acompanhada de imagens representativas obtidas por MEV (as imagens não estão à escala) (A – Adesivo, CH – camada, R – resina composta restauradora) (adaptado de [28]).

2.3.1.2 Estratégia *Self-Etch*

A estratégia *SE* tem por base uma combinação de monómeros ácidos, com um pH relativamente superior ao do ácido fosfórico utilizado nos sistemas adesivos *ER*, que, além de dissolverem parcialmente a *smear layer* e os *smear plugs*, desmineralizam a dentina e infiltram-na em simultâneo [8][20][44]. Esta estratégia vem simplificar a técnica de adesão uma vez que dispensa determinadas etapas, tais como o condicionamento ácido isolado e posterior lavagem, etapas sensíveis do procedimento de adesão (Figura 2. 5) [4].

A água também faz parte da constituição destes sistemas adesivos e providencia o meio de ionização para os monómeros ácidos possibilitando, assim, o auto-condicionamento [20][44]. No sentido de aperfeiçoar a técnica ainda são acrescentados monómeros 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA), de carácter fortemente hidrofílico, com o objetivo de aumentarem a hidrofiliicidade do adesivo e diminuir a sua viscosidade. Mais recentemente também têm sido adicionados monómeros como o 10-monodihidrogenofosfato (10-MDP), o 4-metacriloxietiltrimelítico (4-MET) e 2-metacriloxietilfenilhidrogenofosfato (fenil-P), que contêm um grupo funcional capaz de estabelecer ligações iónicas, mais estáveis com o cálcio da hidroxiapatite [4][20][44].

No tocante a esta estratégia, e mediante o pH das suas soluções, os sistemas adesivos ainda podem ser classificados em: “fortes” ($\text{pH} < 1$), “moderados” ($\text{pH} \approx 1,5$), “fracos” ($\text{pH} \approx 2$) e “ultra-fracos” ($\text{pH} > 2,5$), com profundidades de interação decrescentes a começar na ordem dos nanómetros até a alguns micrómetros, respetivamente [4][20][44].

Os monómeros ácidos vão sendo gradualmente tamponados pelo conteúdo mineral presente no substrato dentário, aquando a sua dissolução. Assim, a profundidade de desmineralização conseguida pelos monómeros é auto-limitada e depende do tipo de substrato [4].

O principal desafio para os sistemas adesivos *SE* consiste em dissolver a *smear layer* sem desmineralizar profundamente a superfície do dente. A preservação deste composto não só se revela importante na proteção da rede de colagénio face à agressão química externa, como também faculta cálcio para a ligação química aos monómeros funcionais [20].

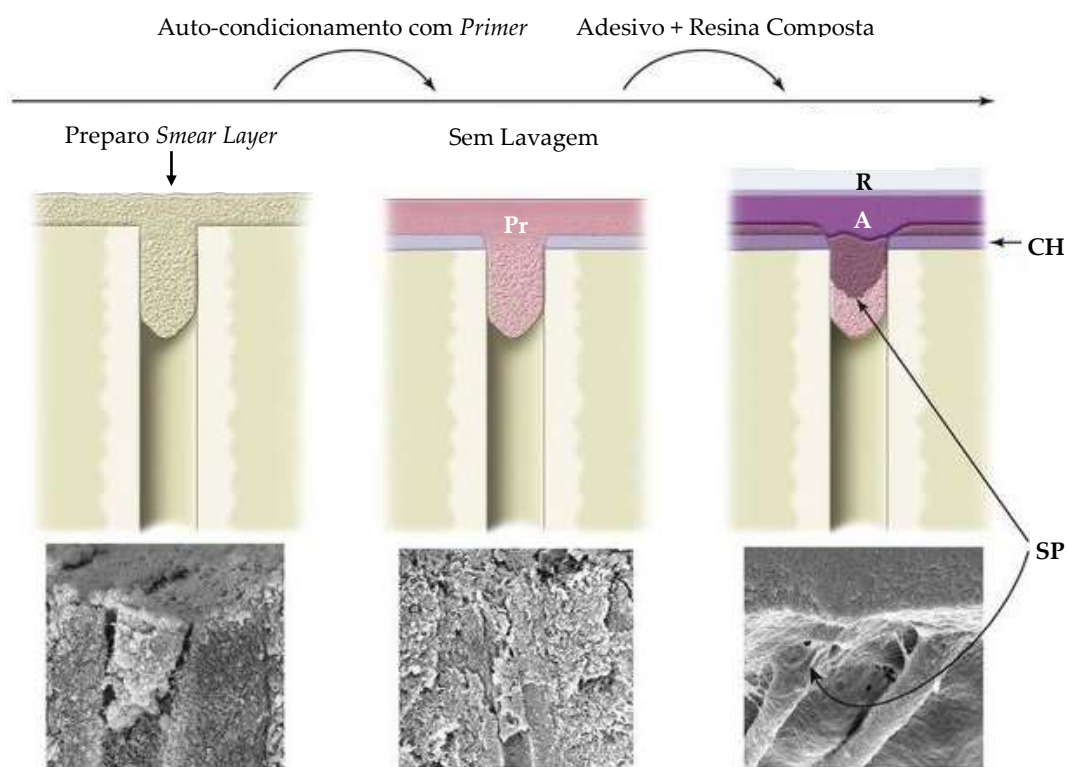


Figura 2. 5 – Ilustração do procedimento restaurador segundo a estratégia *SE*, acompanhada de imagens representativas obtidas por MEV (as imagens não estão à escala) (A – Adesivo, CH – camada

híbrida com manutenção da *smear layer*, Pr – *primer* ácido, R – resina composta restauradora, SP – *smear plug*) (adaptado de [28]).

Cada grupo de sistemas adesivos (*ER* e *SE*) é subdividido de acordo com o número de passos clínicos requeridos na realização do procedimento restaurador (Tabela 2. 1).

Tabela 2. 1 – Classificação e caracterização das duas estratégias de aplicação dos sistemas adesivos (*ER* e *SE*) [8].

Estratégia	<i>Smear Layer</i>	Condicionamento ácido	Número de passos clínicos
<i>ER</i>	Remove-a completamente.	Usa um passo separado para condicionar com ácido (e.g., 35-37% ⁷ ácido fosfórico).	3-passos – Aplicação de três componentes separados: ácido ortofosfórico, seguido de lavagem, <i>primer</i> e finalmente adesivo.
			2-passos – Combinação do <i>primer</i> e do adesivo numa só solução, aplicados após o condicionamento com ácido ortofosfórico e lavagem.
<i>SE</i>	Não a remove completamente mas dissolve-a parcialmente.	Inclui monómeros acídicos que, simultaneamente, condicionam e infiltram o substrato.	2-passos – Aplicação de um <i>primer</i> ácido seguido de evaporação do solvente e posterior aplicação do adesivo.
			1-passo – Combinação do <i>primer</i> e do adesivo numa só solução, aplicados após o condicionamento com ácido.

O *primer* consiste numa solução de monómeros diluídos em solventes orgânicos que concedem ao material propriedades hidrofílicas com afinidade para a rede de colagénio exposta e propriedades hidrofóbicas para permitir a copolimerização com a resina adesiva hidrofóbica [4][38][44][45]. O HEMA é um dos monómeros mais frequentemente incorporado como solvente nos *primers* dos sistemas adesivos simplificados mais recentes [4].

Os solventes mais utilizados são o etanol e a acetona (solventes orgânicos) e a água, por serem de fácil acesso e apresentarem biocompatibilidade [4].

⁷ É a mais frequente, mas pode variar entre 30-40%

2.3.2 Limitações ao uso de Sistemas Adesivos Dentários

Para além da panóplia de vantagens que os sistemas adesivos acarretam, a sua utilização também alberga algumas preocupações/limitações, entre elas a já mencionada nanoinfiltração, hidrólise por parte das metaloproteinases da matriz (MMPs) de ação colagenolítica, capazes de clivar a molécula de colagénio tanto intacta como desnaturada, a exposição contínua aos fluidos orais, com consequente possível absorção de água pelo polímero formado na interface adesiva e, por fim, os processos cumulativos de fadiga mecânica, térmica e química sobre esta mesma interface [4].

2.4 Resinas Compostas

As resinas compostas podem apresentar diversas conjugações de componentes na sua constituição, sendo a matriz orgânica, o conteúdo inorgânico, o agente de ligação e o sistema de iniciação, transversais a todas elas. A matriz orgânica é constituída predominantemente por monómeros dimetacrilatos – bisfenol-A-glicidilmetacrilato (Bis-GMA), trietilenoglicoldimetacrilato (TEGDMA), uretanodimetacrilato (UDMA), bisfenol-A-glicidiletoxiladodimetacrilato (Bis-EMA) – que aumentam a mobilidade molecular e a reatividade da resina, aumentando significativamente o seu *DC*. O conteúdo inorgânico tem por base diversas formas de sílica, entre elas a sílica cristalina e a sílica amorfa e também uma associação de sílica com metais. A adição de partículas de carga à matriz polimérica das resinas compostas é determinante no desenvolvimento das suas propriedades físicas e mecânicas, na medida em que diminui a contração da polimerização, aumenta a resistência mecânica e diminui o coeficiente de expansão térmica. O agente de ligação vem possibilitar a adesão da superfície das partículas inorgânicas à matriz de resina, previamente tratadas quimicamente com este, sendo o mais frequentemente utilizado, o γ -metacriloxipropiltrimetoxisilano (γ -MPTS), comumente designado por silano [4].

3. Estado da Arte

A adesão dentária é um procedimento muito frequente na prática da Medicina Dentária e que se encontra em constante desenvolvimento dada a crescente ambição em aperfeiçoar os sistemas adesivos e metodologias de aplicação que se traduzam em melhores soluções de restauração a longo prazo.

O estudo da adesão dentária iniciou-se com Buonocore em 1955 que, após observar a aplicação do ácido fosfórico como pré-tratamento da superfície de metais antes da sua pintura, tentou reportar a técnica para fazer aderir resina acrílica ao esmalte dentário aplicando neste, ácido fosfórico a 85% [42]. Perante a validade dos resultados obtidos, em 1965, Buonocore replicou a técnica do “ataque ácido” para tentar aderir à dentina. Primeiramente usou ácido hidrocloreídrico (HCl) na superfície da dentina para depois tentar aderir a molécula de GPDM (ácido glicerofosfóricodimetacrilato). Tendo sido considerado o pioneiro da adesão dentária pelo desenvolvimento da técnica do condicionamento ácido, na altura, este procedimento ainda se encontrava um pouco aquém de ser fiável. Mais tarde, o condicionamento ácido do esmalte, com concentrações e tempos de aplicação mais reduzidos, converteu-se numa técnica clinicamente comprovada com aumento da retenção das restaurações e diminuição da microinfiltração marginal [8][38].

Bowen tentou criar uma adesão química ao cálcio que fosse resistente à água e sintetizou a molécula bifuncional de N-fenilglicina e glicidil-metacrilato (NPG-GMA), em que uma das extremidades se ligava à dentina e a outra polimerizava com a resina composta, tendo constituído a base para o primeiro agente adesivo dentinário comercialmente disponível [8][38]. Após vários estudos, a sua principal inovação foi a criação de uma resina com matriz orgânica à base de Bis-GMA e a utilização de um silano, com o objetivo de unir a matriz orgânica hidrofóbica a partículas de carga inorgânicas hidrofílicas [46].

Um outro avanço importante na adesão à dentina ocorreu quando Fusayama, em 1979, usou ácido fosfórico a 37% para condicionar tanto o esmalte como a dentina. Este estudo demonstrou que o procedimento não aumentava o prejuízo ao nível pulpar e que fazia melhorar, substancialmente, a retenção da restauração [29].

Nakabayashi, em 1982, definiu a formação da CH, resultante da infiltração de monómeros resinosos entre as fibras de colagénio expostas na dentina desmineralizada [29].

Kanca, em 1992, demonstrou que a resistência adesiva dos adesivos aplicados sobre a dentina mantida húmida, após remoção do ácido com jato de água, era maior do que a

união conseguida quando a dentina era excessivamente seca. No mesmo ano, Pashley concluiu que a secagem excessiva da dentina desmineralizada, com jato de ar, causava um colapso das fibras de colagénio, reduzindo a porosidade superficial e prejudicando a impregnação do adesivo e consequente formação da CH [47].

As técnicas de Espetroscopia μ -Raman e MEV têm vindo a ser empregues em vários estudos relacionados com a área da Medicina Dentária [48][49].

O efeito de Raman tem sido um fenómeno-alvo usado para o estudo da interface entre a dentina e o material restaurador. Através da Espetroscopia μ -Raman é possível obter uma análise química qualitativa e quantitativa, *in situ*, dos componentes desta interface e assim inferir quanto ao sucesso da adesão, tendo por base os dados referentes aos DC e DD [7][50]. Ao longo dos anos têm sido vários os investigadores a ocuparem-se deste estudo embora quase todos o realizem em dentes íntegros e tempos reduzidos de envelhecimento [9].

Até ao final dos anos 90, a interface dentina/adesivo tinha sido apenas estudada a nível morfológico, em conjunto com a medição das forças de resistência adesiva nela envolvidas. Spencer, *et al.* (2000) focaram-se na determinação, a nível molecular, de diferenças quantitativas na composição da interface dentina/adesivo formada sob condições húmidas de adesão, através de estudos de Espetroscopia μ -Raman [50].

Wang e Spencer (2001), seguindo a mesma linha de raciocínio e através da mesma técnica conseguiram determinar quantitativamente o grau de penetração de vários sistemas adesivos na interface dentina/adesivo. Embora se tenham verificado resultados discrepantes em todos eles, constatou-se uma diminuição gradual da penetração dos sistemas adesivos ao longo da interface, resultados estes que podem ser justificados pelos procedimentos de aplicação usados, diferentes solventes envolvidos, concentração e diferenças na hidrofobicidade de cada sistema adesivo [51].

Santini e Miletic (2008) afirmaram que os monómeros podiam estar na causa de um aumento da instabilidade da restauração a longo prazo e irritação pulpar. Neste sentido, e recorrendo à Espetroscopia μ -Raman, realizaram um estudo que se focava no cálculo e na quantificação da desmineralização da dentina, bem como na penetração do sistema adesivo e no DC dos sistemas adesivos testados ao longo da interface dentina/adesivo. Este estudo foi ao encontro de outros realizados anteriormente, com outras técnicas, que verificaram que os sistemas adesivos ER eram os que proporcionavam maior desmineralização da dentina [7].

Navarra, *et al.* (2009), através da técnica de Espetroscopia μ -Raman, calcularam o DC na CH e também estudaram a nanoinfiltração na interface de três sistemas adesivos SE de 1-passo. Os resultados obtidos foram coerentes com outros estudos realizados anteriormente que indicaram que o grau de permeabilidade da interface poderia estar relacionado com a presença de monómeros não polimerizados na CH. Em particular, que os sistemas adesivos SE de 1-passo mostravam maiores graus de permeabilidade associados a um baixo DC, em comparação com sistemas adesivos menos simplificados. Constataram assim que, apesar da simplicidade de aplicação dos sistemas adesivos SE estes exibem, no imediato, pouca

força de resistência adesiva e perda de estabilidade a longo prazo dado que formam uma CH semi-permeável depois da polimerização, potenciando a degradação [5].

Zou, *et al.* (2009) realizaram um estudo que se baseou na determinação da concentração molar absoluta dos componentes de um adesivo *ER* de 3-passos na CH, através da técnica de Espetroscopia μ -Raman. Os resultados revelaram que a concentração molar absoluta dos componentes do adesivo diminuía significativamente ao longo da CH, revelando que estes não infiltravam totalmente a matriz de dentina desmineralizada. Ainda assim, constatou-se que os monómeros HEMA infiltravam mais a CH que os Bis-GMA. Zou, *et al.*, indo ao encontro de estudos anteriormente realizados, afirmaram que a falha da completa infiltração do monómero poderia influenciar a longevidade da ligação [19].

Park, *et al.* (2011), no sentido de aperfeiçoarem o desenvolvimento e aumentar a durabilidade dos sistemas adesivos dentinários, investigaram a influência da estrutura química dos monómeros de metacrilato mais comuns (Bis-GMA e HEMA) no *DC*, na absorção de água e na solubilidade, de seis sistemas adesivos experimentais. Através da técnica de Espetroscopia μ -Raman, os resultados indicaram que o valor do *DC* aumentava com o aumento do número de unidades de etilenoglicol no monómero. Por outro lado, verificou-se que o aumento destas unidades e a absorção de água também estavam relacionadas positivamente, resultados que poderiam estar associados ao aumento da hidrofiliabilidade e flexibilidade dos sistemas devido ao aumento do número de unidades de etilenoglicol. Constatou-se também que a uma baixa solubilidade estaria associada um elevado *DC*, bem como o aumento da concentração de Bis-GMA [36].

Hass, *et al.* (2013) pretenderam relacionar o *DC* da CH com a força resistência adesiva e a nanoinfiltração de cinco sistemas adesivos *ER* simplificados. Os resultados foram coerentes com os estudos supracitados, mostrando que o *DC* se relacionava positivamente com os valores de resistência adesiva obtidos, mas negativamente com a nanoinfiltração medida [52].

A MEV, por ser uma das técnicas mais versáteis para a observação e a análise microestrutural de objetos sólidos, dada a alta resolução e a aparência tridimensional em que as imagens são obtidas, tem sido usada como técnica complementar na análise morfológica da interface entre a dentina e o material restaurador [53]. Ao longo dos anos, à semelhança do supracitado, também se tem verificado que os estudos são predominantemente realizados em dentes íntegros.

Sato e Miyazaki (2005) investigaram o grau de penetração de resina composta em dentina condicionada por dois sistemas adesivos universais distintos, com estratégia *SE*, e por um adesivo *SE* de 2-passos. Os resultados mostraram que o grau de penetração dos sistemas adesivos universais era menor quando comparado com o adesivo de 2-passos. Constataram também que a espessura da CH era superior quando analisada através de Espetroscopia μ -Raman, relativamente à medida por MEV. Os investigadores justificaram este acontecimento com uma possível contração decorrente do tratamento dos espécimes para análise em MEV [54].

No âmbito da Medicina Dentária, é possível determinar o *DC* do sistema adesivo enquanto constituinte da CH, a profundidade de desmineralização da dentina e a extensão de penetração do adesivo no substrato [19][51][55].

4. Técnicas Analíticas

4.1 Espetroscopia Micro-Raman

O efeito de Raman foi previsto teoricamente por A. Smekal, na década de 1920, tendo sido verificado experimentalmente, em 1928, por Sir C. Raman, juntamente com a colaboração do cientista K. Krishna [56]. Em 1930, Sir C. Raman foi condecorado com o Prémio Nobel da Física pelos seus estudos sobre a dispersão da luz [12][57][58].

A Espetroscopia μ -Raman é uma técnica com excelente resolução espacial que permite a análise da radiação difundida em diferentes comprimentos de onda, por uma amostra, quando nela incide um feixe de radiação monocromático. Este processo revela informação de qualquer material ou composto orgânico e/ou inorgânico, permitindo qualificar e quantificar a sua composição química [12][58][59].

4.1.1 O Princípio Físico – Descrição do Efeito de Raman

A radiação interage com a matéria de maneiras diferentes e, consequentemente, pode ser transmitida, absorvida ou difundida. A análise mediante a Espetroscopia μ -Raman baseia-se no estudo da radiação difundida (inelasticamente) por uma amostra (*e.g.*, molécula) quando nela incide um feixe de radiação monocromática. A radiação pode ser difundida com a mesma frequência (ν_0) ou com uma frequência diferente da radiação incidente, $(\nu_0 + \nu_{\text{vib}})$ e $(\nu_0 - \nu_{\text{vib}})$. No primeiro caso, ocorre difusão elástica, uma vez que o fóton e a molécula colidem elasticamente – difusão de Rayleigh –, ao passo que no segundo, a difusão é inelástica, e o fóton é difundido com maior ou menor energia – efeito Raman [12][57]. Este efeito, ainda que bastante menos provável de ocorrer comparativamente com a difusão de Rayleigh, é resultado da variação dos níveis da energia de rotação e/ou de vibração da molécula [12][58].

O momento dipolar induzido (p) ocorre em resultado da polarizabilidade molecular⁸ (α) e também depende da amplitude da componente elétrica da radiação (E) [12][58]:

⁸ Capacidade de distorção da nuvem eletrónica da molécula

$$p = \alpha E \quad (\text{Equação 4. 1})[12][58]$$

Por sua vez,

$$E = E_0 \cos(2\pi \nu_0 t) \quad (\text{Equação 4. 2})[12][58]$$

E o tensor de polarizabilidade molecular, α , pode ser decomposto, sendo que q representa a vibração molecular:

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{d\alpha}{dq} q_0 \cos(2\pi \nu_{vib} t) \quad (\text{Equação 4. 3})[12][58]$$

E tem-se,

$$p = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi \nu_0 t) + \frac{1}{2} \frac{d\alpha}{dq} q_0 E_0 [\cos(2\pi (\nu_0 - \nu_{vib}) t) + \cos(2\pi (\nu_0 + \nu_{vib}) t)] \quad (\text{Equação 4. 4}) [12][58].$$

Na descrição clássica do efeito Raman, a radiação difundida contém três frequências – ν , $\nu - \nu_{vib}$, $\nu + \nu_{vib}$ – nas quais o momento dipolar induzido vai oscilar. Estas frequências determinam, respetivamente, as bandas da difusão de Rayleigh (primeiro termo da equação), as bandas Raman Stokes (segunda termo da equação) e por último, as bandas Raman anti-Stokes (terceiro termo da equação) (Figura 4. 1) [12][58].

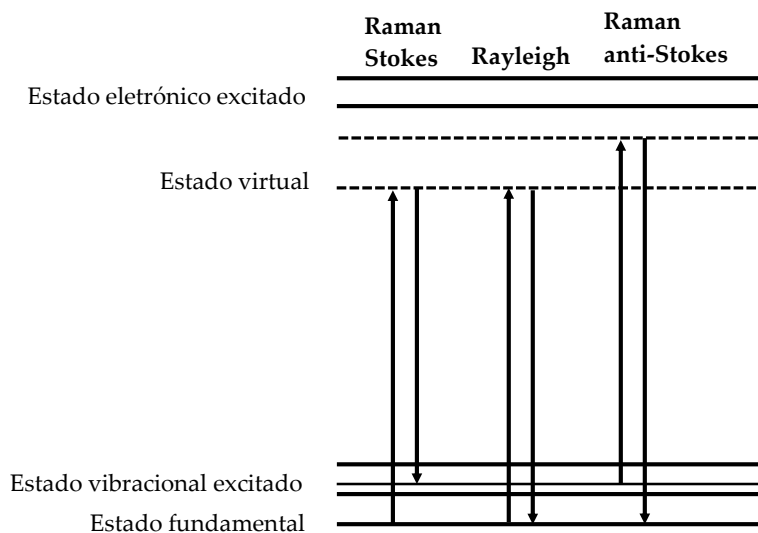


Figura 4. 1 – Diagrama de níveis de energia com discriminação das transições espectroscópicas envolvidas no sinal Raman (adaptado de [58]).

O “estado de energia virtual” para o qual/do qual os fótons transitam não é necessariamente um verdadeiro estado quântico, mas pode ser considerado como a referida distorção da nuvem eletrônica da molécula [57].

A diferença de frequências supracitada origina bandas no espectro Raman, cada uma referente à sua frequência vibracional característica. Dado que cada amostra é caracterizada por um conjunto de modos de vibração molecular que lhe são específicos, torna-se possível a identificação indubitável da amostra em estudo [12][59]. Num espectro de Raman obtém-se, assim, a energia (em unidades de número de onda) em função da intensidade da radiação difundida.

4.1.2 Vibrações Moleculares

Os átomos encontram-se constantemente a oscilar em torno das suas posições de equilíbrio e estes movimentos contínuos estão na origem das vibrações moleculares. Estas, por sua vez, diferenciam-se em duas categorias: *stretching*⁹ e/ou *bending or deformation*¹⁰ [12]. As primeiras consistem na variação contínua na distância inter-atômica ao longo do eixo de ligação entre dois átomos, ao passo que as segundas são caracterizadas pela variação do ângulo entre duas ligações [12][23]. Na Figura 4. 2 é possível observar as diferentes especificações que as categorias atrás mencionadas podem tomar.

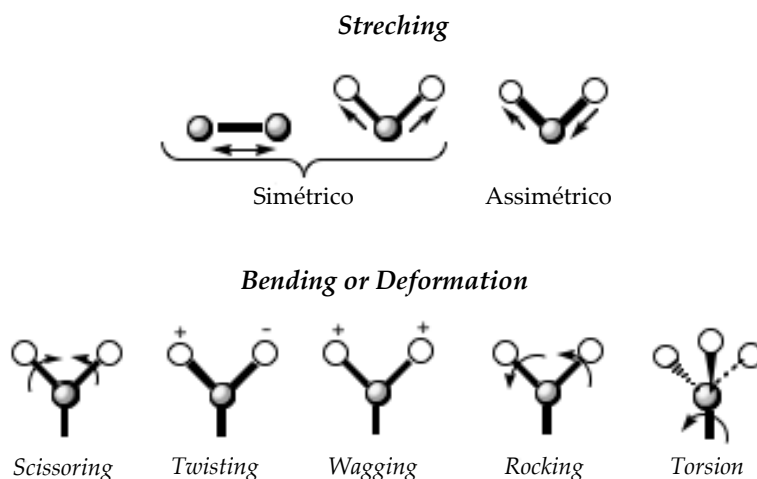


Figura 4. 2 – Ilustração dos tipos de vibrações moleculares: *stretching* e/ou *bending or deformation* (adaptado de [60]).

⁹ Alongamento ou elongação das ligações moleculares

¹⁰ Deformações angulares

4.1.3 Instrumentação

Um espectro Raman é obtido após se fazer incidir sobre a amostra um feixe laser, mais especificamente um laser díodo, proveniente de uma fonte de excitação. Este tipo de laser, para além da sua elevada eficiência e dimensão reduzida, ao possuir comprimentos de onda específicos, é possível discriminar aquele que, neste caso específico, minimize a fluorescência¹¹; é comum recorrer a um laser de 785 nm [12][23].

De forma a focar corretamente o feixe incidente na amostra e recolher eficientemente a radiação difundida por esta, é acoplado ao espectrómetro um microscópio ótico com diversas ampliações (10x, 50x e 100x). Assim, a radiação dispersa, depois de redirecionada para a objetiva do microscópio é coletada por um filtro de rejeição do tipo *notch* que permite separar os sinais tendo em conta as diferentes frequências e, principalmente, eliminar a radiação Rayleigh que se caracteriza bastante mais intensa e ofuscante que a Raman [12][23]. Por conseguinte, a radiação Raman é focada para a abertura *pinhole* e é reorientada para a fenda de entrada do monocromador sendo posteriormente coletada por um detetor CCD¹². Este funciona como um detetor, altamente sensível a fotões, que permite a conversão da intensidade da radiação em sinais elétricos, que são depois interpretados por um computador. Este processo dá origem a um espectro Raman [12][23][57].

4.1.4 Vantagens e Limitações da Técnica

A Espetroscopia μ -Raman é uma técnica que reúne várias vantagens, entre elas o facto de ser não-destrutiva, uma vez que é possível controlar a intensidade do laser incidente e também é exigido o mínimo tratamento prévio da superfície da amostra a analisar. A técnica faz uso de um microscópio ótico e ao utilizar um *setup* com geometria confocal é possível reduzir bastante a área a analisar permitindo o estudo de áreas de cerca de 1 μm de diâmetro [12][59][61].

Por outro lado, a técnica é limitada por poder apresentar fluorescência e pelo elevado custo do equipamento [12].

¹¹ Acontece quando uma substância absorve e, imediatamente a seguir, emite radiação (zona do espectro visível) e caracteriza-se por ser um sinal bastante mais intenso que o de Raman, tornando-se uma interferência

¹² Do inglês *Charge Coupled Devices*

4.2 Microscopia Eletrónica de Varrimento

M. Knoll foi o primeiro a descrever a conceção do Microscópio Eletrónico de Varrimento (MEV), em 1935 [62].

Na sua forma mais simples, esta técnica baseia-se na deteção e quantificação das diferentes radiações e partículas emitidas por uma amostra como resposta a uma excitação eletrónica incidente de alta energia [63]. Os dados recolhidos permitem obter imagens numa gama de ampliação elevada (desde 20x até 200000x), com uma profundidade de campo de 30 μm e uma resolução espacial de 10 nm possibilitando, assim, a análise microestrutural de materiais sólidos [64][65].

4.2.1 O Princípio Físico – Interação do Feixe Eletrónico com a Matéria

Quando um eletrão acelerado, carregado com uma quantidade significativa de energia cinética, colide com a superfície de uma amostra alvo interage com os átomos constituintes desta. No seguimento desta colisão, o eletrão pode sofrer alteração na sua velocidade inicial, em direção e/ou em magnitude, dando origem a interações elásticas ou inelásticas [62][66]. Se o eletrão penetra o átomo com energia suficiente para alcançar o núcleo, este irá exercer no eletrão uma força denominada de força de Coulomb. Uma vez que a massa do núcleo excede em muito a massa do eletrão, o movimento do núcleo é muito pouco afetado pelo do eletrão e este é desviado sem sofrer redução considerável na sua energia – dispersão de Rutherford – existindo, assim, conservação de momento e energia – interação elástica. A origem dos eletrões retro-difundidos baseia-se neste fenómeno. Por outro lado, o eletrão do feixe incidente também interage com os eletrões do próprio átomo, estabelecendo-se entre eles uma força repulsiva coulombiana com transferência de uma certa quantidade de energia do eletrão incidente para o eletrão ligado – interação inelástica [62][66]. A transferência de energia cinética pode levar à ionização ou excitação do átomo, conforme a quantidade de energia transferida.

A excitação do átomo é um mecanismo semelhante ao da ionização, mas em que a quantidade de energia transferida é menor do que a energia de ligação do eletrão, ficando o átomo apenas excitado – o eletrão passa para uma orbital mais exterior. A maioria dos eletrões das camadas mais externas do átomo, e porque requerem pouca energia para serem removidos, são os mais propensos a serem libertados e/ou excitados, dando origem aos eletrões secundários (ES) [62][66].

4.2.2 Princípio de Funcionamento – Construção da Imagem

A MEV baseia-se fundamentalmente na emissão de um feixe de elétrons, por um filamento de tungstênio, que é acelerado, colimado através de uma coluna ótico-eletrônica e, posteriormente, conduzido à câmara que contém a amostra. Este feixe é focalizado e reduzido por um sistema de lentes eletromagnéticas, diafragmas e bobinas que ao incidir sobre a amostra provoca uma série de emissões de sinais provenientes das interações elétron-amostra. As interações daí advindas podem resultar na emissão de elétrons *Auger*, ES, elétrons retro-difundidos, radiação característica (fotões), entre outros (Figura 4. 3). Os sinais são captados por detetores específicos e, por conseguinte, geram uma imagem virtual consoante o feixe incidente vai percorrendo a área em análise [62][66][65].

De maneira a garantir o livre percurso médio dos elétrons é necessário operar num sistema de alto vácuo (933 - 1333 Pa) [65].

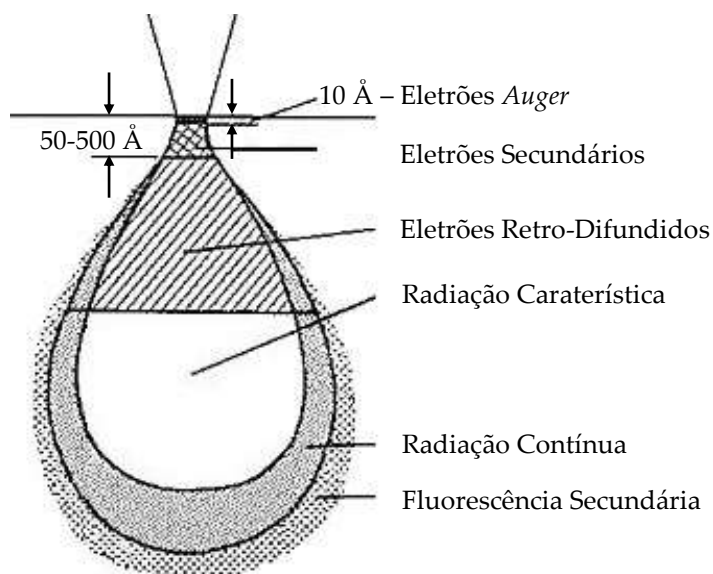


Figura 4. 3 – Esquema representativo do volume de interação dos elétrons na amostra (forma em gota) e origem de alguns sinais (adaptado de [67]).

4.2.2.1 Imagem formada/obtida por Elétrons Secundários

Os ES são resultado das interações inelásticas entre o feixe eletrónico incidente com os elétrons das camadas mais externas dos átomos que integram a amostra e são definidos consoante a sua energia cinética, sendo os que apresentam energia inferior a 50 eV [66]. O sinal proveniente destes é o mais utilizado para análise de amostras por MEV por ser o que constitui maior resolução (3-5 nm) [53][66].

A quantidade de ES ejetados da amostra, i_{ES} , está relacionada com a quantidade de elétrons incidentes/primários, i_{EP} , através do coeficiente de emissão de ES, δ :

$$\delta = \frac{i_{ES}}{i_{EP}} \quad (\text{Equação 4. 5}) [66]$$

Este coeficiente, por sua vez, é inversamente proporcional à energia do feixe incidente, pois ao diminuir a energia do feixe incidente, uma vez que a sua penetração é menor, são ejetados mais ES numa região mais superficial (Figura 4. 3) [66]. Desta forma, estes caracterizam-se por ter uma baixa profundidade de escape, pois embora sejam gerados em todo o volume de interação do feixe eletrónico com a amostra, apenas os que se encontram próximos da superfície é que têm energia suficiente para escapar da amostra. Define-se a probabilidade de escape, Pe [66]:

$$Pe \sim e^{\frac{-z}{\lambda}} \quad (\text{Equação 4. 6}) [66]$$

Onde z representa a profundidade onde foi gerado o ES (unidades de comprimento) e λ o livre percurso médio deste (unidades de comprimento) [66].

Finalmente, as imagens obtidas são o resultado de variações de contraste dadas principalmente pelo relevo da amostra quando um feixe eletrónico incidente percorre a superfície desta. Estas variações ocorrem devido às diferenças entre o número de elétrons que são ejetados da amostra e o que atingem o detetor [53][66].

4.2.3 Vantagens e Limitações da Técnica

A MEV é uma técnica dotada de uma panóplia de vantagens uma vez que possibilita a análise microestrutural de materiais sólidos e a obtenção rápida de imagens de alta resolução e elevada profundidade de campo que, por sua vez, lhes fornece uma aparência tridimensional [66][68]. Por outro lado, também acarreta algumas desvantagens, entre elas a grande dimensão e o elevado custo de compra e manutenção dos equipamentos, o facto de ser exigido um tamanho reduzido dos espécimes a fim de caberem no interior da câmara de vácuo (10 cm horizontal, 40 mm na vertical), e serem resistentes à pressão operada [64][68]. Além disso, ao contrário da Espetroscopia μ -Raman, a MEV exige uma preparação prévia dos espécimes, sobretudo quando se trata de material orgânico e não condutor.

5. Materiais e Métodos

Com o objetivo de avaliar a qualidade da adesão de um sistema adesivo universal, segundo as suas duas estratégias de aplicação, em dentinas sã e afetada, e estudar como esta poderá ser influenciada pelo tempo de envelhecimento, este projeto visa adquirir e analisar registos espectrográficos e de imagem da interface adesiva entre a dentina e o material restaurador. No presente capítulo encontra-se apresentada a metodologia adotada a fim de realizar o proposto. Os procedimentos experimentais relativos à preparação e adesão dos espécimes e posterior aquisição de imagens de MEV foram realizados na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa (FMDUL) e a aquisição de espetros Raman foi desenvolvida no Centro de Física Atómica do Departamento de Física, da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL). A componente experimental deste estudo decorreu entre dezembro de 2015 e julho de 2016.

5.1 Seleção dos Dentes

No presente estudo selecionaram-se aleatoriamente doze dentes molares humanos provenientes do Banco de Dentes da Unidade de Investigação em Ciências Orais e Biomédicas (UICOB) da FMDUL. Os dentes foram extraídos por motivos periodontais ou ortodônticos e conservados numa solução aquosa de cloramina 0,4%.

Dos doze dentes selecionados, metade apresentavam como critério de inclusão o facto de serem hígidos e os restantes não-hígidos, i.e., que apresentam lesão de cárie cavitada, mas sem qualquer procedimento restaurador já realizado.

5.2 Sistema Adesivo Universal, Resina Composta e Ácido

Os materiais utilizados para o presente estudo foram facultados pelo UICOB, FMDUL, e consistiram em (Figura 5. 1):

- Sistema adesivo universal [Futurabond M+, lote 1418283, val 2016.04 (Voco, Cuxhaven, Alemanha)]¹³ (a sua composição encontra-se no Anexo I);
- Resina composta fluída restauradora [Tetric EvoFlow, lote R65600, val 2016.08 (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein)] (a sua composição encontra-se no Anexo I);
- Ácido ortofosfórico [Vococid, 35%, lote 1349113, val 2016.04 (Voco, Cuxhaven, Alemanha)].



Figuras 5. 1 – Fotografias dos materiais utilizados no procedimento restaurador. A) ácido ortofosfórico Vococid; B) resina composta Tetric EvoFlow; C) sistema adesivo universal Futurabond M+).

5.3 Preparação dos Espécimes

5.3.1 Corte

Os dentes foram acoplados com cola quente a uma base de resina acrílica de forma a estabelecer-se uma base rígida e auxiliar o corte dos mesmos. Com uma serra diamantada, montada numa máquina de corte (Buehler, IsoMet1000 Precision Saw, 750 rpm), removeu-se a parte oclusal e a parte radicular de cada dente, resultando uma fatia transversal em relação ao longo eixo do dente, com cerca de 2,5 mm de espessura tendo sido esta, de seguida, cortada ao meio, a fim de se obterem duas hemi-fatias por dente (Figura 5. 2). Posteriormente, simulou-se a *smear layer* obtida clinicamente aquando da realização do preparo cavitário com instrumentos rotativos, através do polimento com uma lixa de SiC

¹³ O sistema adesivo presentemente estudado é fotopolimerizável uma vez que contém iniciadores que desencadeiam a reação de polimerização quando ativados por uma fonte luminosa (400-500nm).

(carbeto de silício) de grão 320 (Buehler, referência 30-5218-320,- Struers, Copenhaga, Dinamarca) (Figura 5. 3). Perante o caso de espécime proveniente de dente não-hígido, após o corte, foi feito um polimento até à obtenção de tecido dentinário afetado, e não infectado (avaliação visual e com recurso a sonda exploradora).

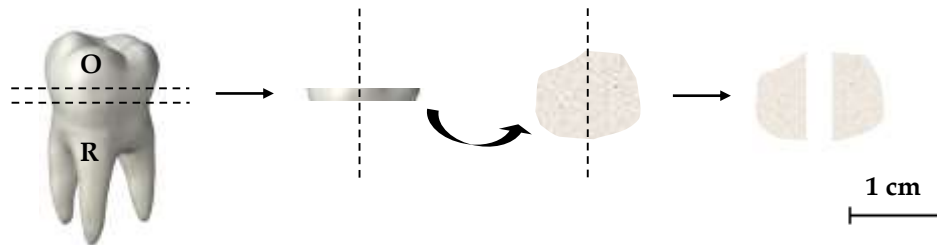
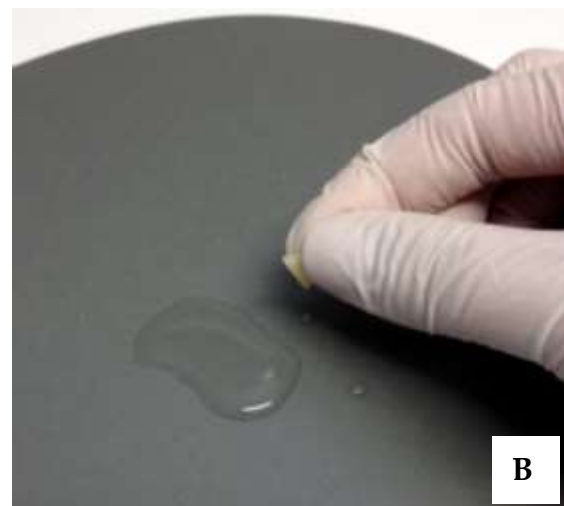
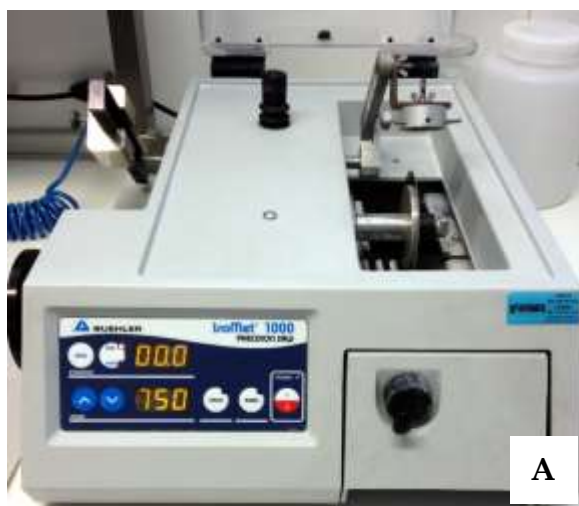


Figura 5. 2 – Esquema representativo do corte de um dente molar. Remoção das partes oclusal (O) e radicular (R), dando origem a uma fatia transversal em relação ao longo eixo do dente tendo esta sido cortada ao meio a fim de se obterem duas hemi-fatias.



Figuras 5. 3 – Fotografias de A) máquina de corte (Buehler, IsoMet1000 Precision Saw), Lab Biomateriais, FMDUL; B) simulação da *smear layer* através do polimento com uma lixa de SiC de grão 320.

Prontamente, os espécimes obtidos foram igualmente distribuídos em oito grupos experimentais (n=3), de acordo com as combinações possíveis entre as variáveis em estudo: tipo de substrato (dentinhas sãs e afetadas), estratégia de aplicação do sistema adesivo universal (*ER* e *SE*) e tempo de envelhecimento (24 h ou 6 M), e conservados em água destilada até ao início do procedimento restaurador (Tabela 5. 1).

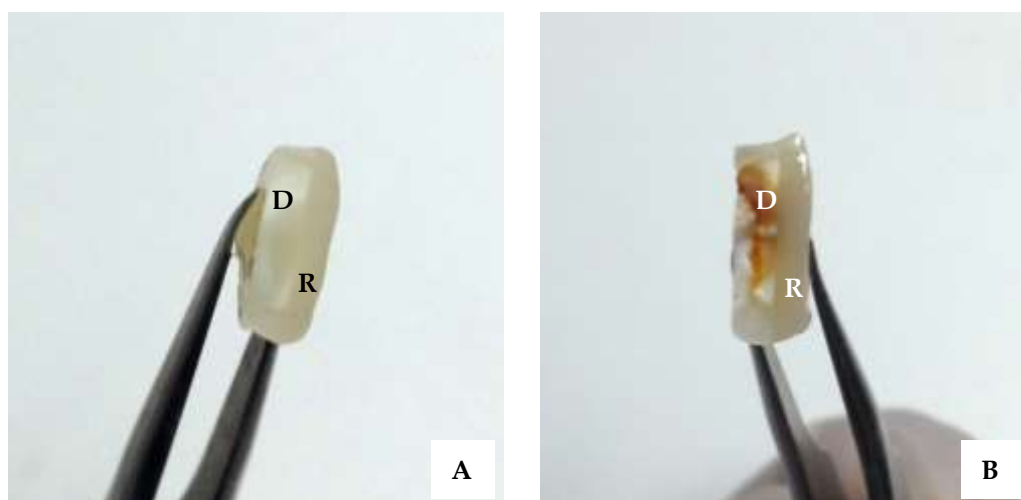
Tabela 5. 1 - Nomenclatura adotada para identificação dos grupos em estudo.

Substrato		São		Afetado	
Tempo	Estratégia	ER (n=3)	SE (n=3)	ER (n=3)	SE (n=3)
	24 h	SER-24	SSE-24	AER-24	ASE-24
	6 M	SER-6	SSE-6	AER-6	ASE-6

5.3.2 Procedimento Restaurador

O procedimento restaurador para as duas estratégias existentes (*ER* e *SE*) respeitante ao sistema adesivo em estudo foi conduzido consoante as instruções do seu fabricante (Anexo II). Ambos os procedimentos experimentais foram aplicados igualmente em dentina são e em dentina afetada (Figura 5. 4).

Os espécimes dos 6 M foram, posteriormente, mergulhados numa solução de benzoazida sódica (pH = 7) e armazenados numa estufa a 37 °C até à sua análise. A solução de armazenamento foi renovada mensalmente. Os espécimes das 24 h ficaram em água destilada e foram analisados após 24 h decorridas do procedimento restaurador.



Figuras 5. 4 – Fotografias das hemi-fatias obtidas após o procedimento restaurador A) em substrato dentinário são; B) em substrato dentinário afetado (D – dentina, R – resina composta restauradora).

5.4 Grau de Conversão e Grau de Desmineralização

Pela técnica de Espectroscopia μ -Raman é possível determinar quantitativamente a relação entre a quantidade de monómeros que polimerizaram e os que permaneceram livres através do cálculo do grau de conversão (DC). Este foi determinado com base na razão entre a intensidade das bandas “reativas” (I_r) – que identificam as duplas ligações – e as de referência (I_{ref}), dos espectros obtidos:

$$\text{Grau de conversão (DC)} = 1 - \frac{\frac{I_{r(pol)}}{I_{ref(pol)}}}{\frac{I_{r(n)}}{I_{ref(n)}}} \times 100\% \quad \text{Equação 5.1 [5]}$$

Onde *pol* representa o adesivo polimerizado e *n* o adesivo não-polimerizado [5].

Na análise espectral, a transição da CH para a dentina é identificada pelo aparecimento gradual da banda correspondente à vibração de alongamento simétrico (*stretching*) do fosfato PO_4^{3-} ($\sim 960 \text{ cm}^{-1}$), característica desta, e pelo desaparecimento gradual das bandas de interesse do sistema adesivo (~ 1610 e $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$, correspondentes às vibrações de alongamento das ligações de carbono) [5].

Na Figura 5. 5 apresenta-se a sobreposição do espectro Raman obtido para o sistema adesivo em estudo com os espectros dos seus principais monómeros constituintes. Aquando da polimerização, a intensidade da banda a 1640 cm^{-1} diminui drasticamente, enquanto que a da 1610 cm^{-1} moderadamente.

O grau de desmineralização (DD) foi determinado para cada ponto medido desde o início da camada da híbrida até ao fim da região desmineralizada pelo ácido.

$$\text{Grau de desmineralização (DD)} = 1 - \frac{I_{desmineralizado}}{I_{mineralizado}} \times 100\% \quad \text{Equação 5.2 [7]}$$

Onde $I_{desmineralizado}$ corresponde à intensidade da banda de fosfato em cada espectro e $I_{mineralizado}$ diz respeito à intensidade da banda de fosfato no máximo de mineralização do substrato.

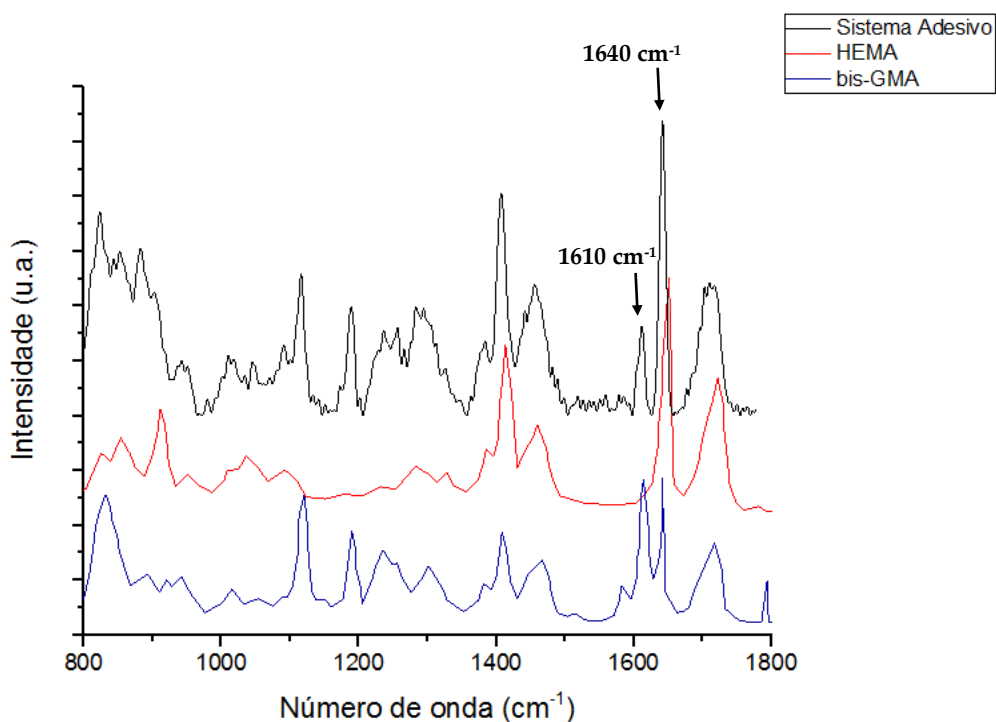


Figura 5. 5 – Representação espectral do sistema adesivo universal (Futurabond M+) e dos principais monómeros constituintes (Bis-GMA e HEMA) e respectiva caracterização das bandas das ligações aromática ($\sim 1610\text{ cm}^{-1}$) e alifática ($\sim 1640\text{ cm}^{-1}$) (adaptado de [19]).

5.4.1 Preparação dos Espécimes para Análise Espectroscópica (μ -Raman)

Cada espécime foi submetido a uma sequência de polimento com lixas de granulometria de 1200 e 2500 (Buehler, referência 30-5218-012 e 30-5218-025, respectivamente, - Struers, Copenhaga, Dinamarca), seguido do polimento com pasta de diamante policristalina de granulometria 1 μm , num pano de feltro para polimento. De seguida, cada espécime foi mergulhado em etanol e submetido a um banho ultrassónico, durante 1 min, de maneira a eliminar resíduos que poderiam influenciar os resultados.

Após efetuadas as medições, os espécimes foram novamente mantidos em água destilada, numa estufa a 37 °C.

5.4.2 Setup Experimental μ -Raman Confocal

No tocante à análise microespectroscópica, usou-se o espectrómetro confocal μ -Raman da XploRA (Horiba/ Jobin-Yvon Xplora, França) composto por um microscópio (Olympus BX41, Japão) com três objetivas (10x, 50x e 100x) (Figura 5. 6). Cada espécime foi colocado no foco da objetiva 100x, sujeito a parâmetros de aquisição que compreendiam uma fonte de laser diodo a operar a um comprimento de onda de 785 nm, um filtro de 50% resultando numa potência na amostra de 9 mW, um *hole* de 300 μm , um *slit* de 100 μm e um *grating* de

1200 *grooves*/mm, obtendo-se uma resolução em energia de 4 cm^{-1} e espacial de, aproximadamente, 1 μm . Os espectros foram adquiridos numa gama entre os 800 cm^{-1} e os 1800 cm^{-1} , com um tempo de exposição de 8 segundos e 5 acumulações, segundo linhas com um *step* de 1 μm ao longo da interface adesiva entre a dentina e o material restaurador. Foram obtidas 4 linhas por espécime em zonas aleatórias da sua superfície, cada uma constituída por 26 espectros. Foram adquiridas fotografias da área de medição através do microscópio (Olympus BX41, Japão) equipado com uma câmara fotográfica Ueye 1640 (Figura 5. 7).

Após a aquisição dos espectros, cada um foi submetido a uma correção da linha de base e tratado com auxílio da ferramenta *fitting* e posterior *smoothing*. No tocante às bandas com relevância para o estudo em causa (banda do fosfato, $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$, e bandas do sistema adesivo, $\sim 1610 \text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$), foi-lhes calculado o valor do seu integral (intensidade). Estas funcionalidades são ferramentas do *software* LabSpec versão 5.58.25 (Horiba/ Jobin-Yvon Xplora, França). Os gráficos foram obtidos com recurso ao *software* Microsoft Excel (2013) e ao OriginLab 92E (OriginLab Corporation, EUA).

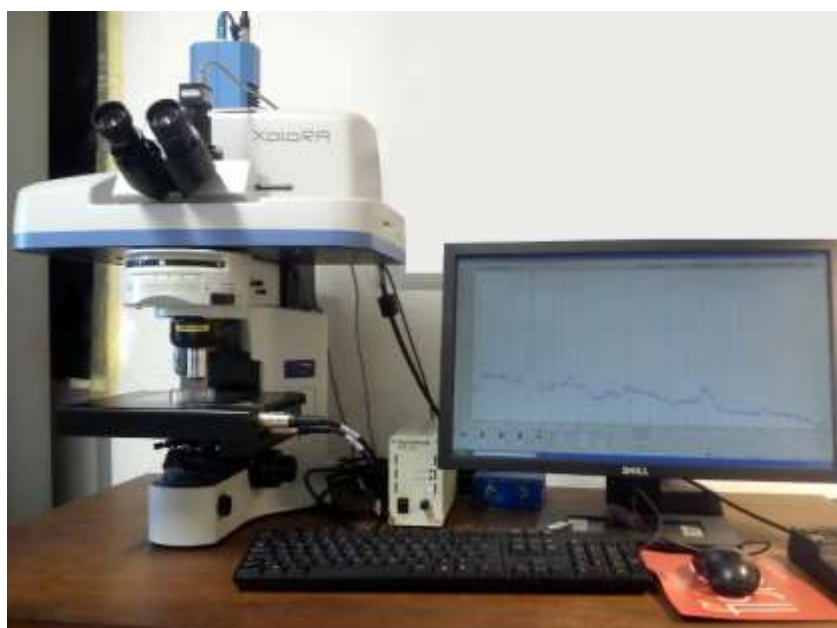


Figura 5. 6 – Fotografia do espectralímetro confocal μ -Raman XploRA (Horiba/ Jobin-Yvon Xplora, França), Lab 120 DF FCT-UNL.

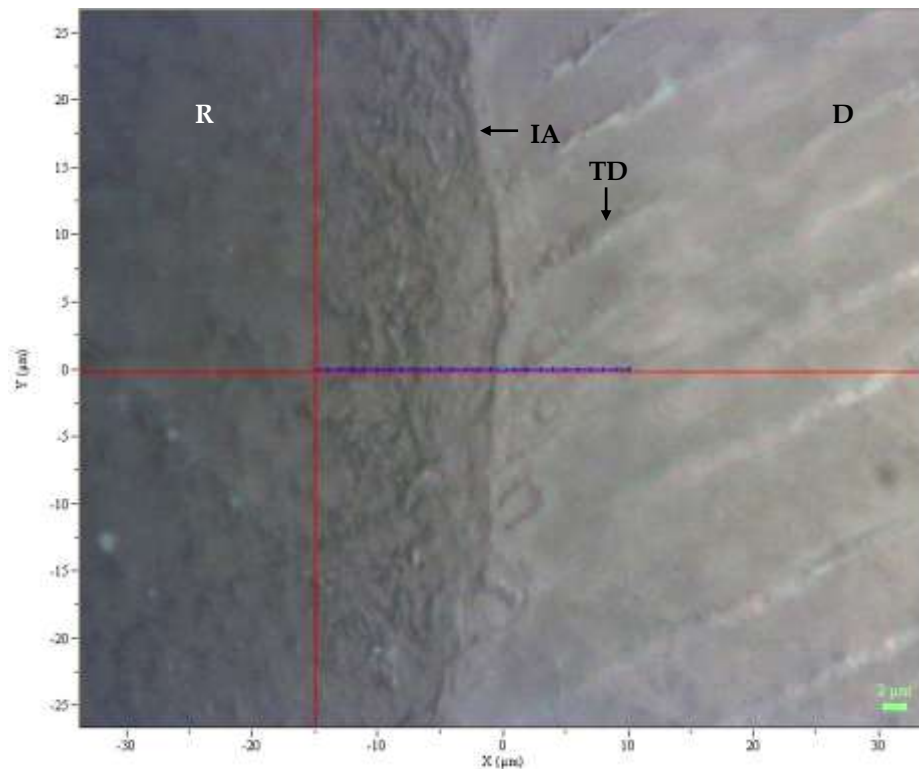


Figura 5. 7 – Imagem de microscópio ótico (100x) com identificação de uma linha de aquisição ao longo da interface adesiva (IA) entre a dentina (D), visualmente identificável pelos túbulos dentinários (TD), e o material restaurador – resina composta (R) (26 espectros com um *step* de 1 μm).

5.5 Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varrimento

5.5.1 Protocolo de Preparação dos Espécimes

A preparação dos espécimes iniciou-se pela sua fixação por imersão em glutaraldeído 2,5% numa solução tamponada de cacodilato de sódio 0,1 M (pH~7,2), durante 24 h, a 4 °C. Após este período, os espécimes foram 3 vezes submersos em cacodilato de sódio 0,1 M (pH~7,2) durante 20 min, seguindo-se uma lavagem com água destilada corrente, a fim de remover por completo o fixador.

De seguida, prosseguiu-se com o polimento da superfície a visualizar no MEV com uma sequência de lixas de granulometria 800, 1500 e 2500 (Buehler, referências 30-5218-800, 30-5218-012 e 30-5218-025, respetivamente,- Struers, Copenhaga, Dinamarca) sob refrigeração, seguido do polimento com pastas de diamante policristalinas de granulometria 3, 1 e 0,25 μm , respetivamente (Aerosol Diamond Spray, referências 50374-16, 50374-11 e 50374-06, respetivamente,- Eletron Microscopy Sciences, Hatfield, Inglaterra), em panos de feltro para

polimento (Figura 5. 8). Entre cada lixa e cada pasta de polimento, os espécimes foram colocados num banho ultrassônico com água destilada durante 1 min. Após o polimento com a última pasta estes foram colocados no banho ultrassônico (Bransonic M2800-E, Danbury, USA), com etanol 100%.

Os espécimes foram, de seguida, sujeitos a uma descalcificação por imersão em HCl 0,1 M durante 2 min e, subsequentemente, lavados com água destilada. Prontamente, foram submersos em hipoclorito de sódio 10%, durante 1 min e, novamente, lavados com água destilada corrente.

Prosseguiu-se uma desidratação dos espécimes, por imersão em concentrações ascendentes de etanol (25% durante 20 min, 50% durante 20 min, 75% durante 20 min, 96% durante 30 min e 100% durante 1 h).

Finalmente, os espécimes foram mergulhados em hexametildisilazano (HMDS), durante 10 min, ficando depois a secar ao ar, à temperatura ambiente, sobre um papel de filtro e na *hotte*, durante a noite.

Prontamente, os espécimes foram acoplados em *stubs* com o auxílio de fita de carbono de dupla face e cobertos com tinta de carbono até 1 mm da interface de adesão, com o objetivo de os tornar mais condutores. De seguida, foram metalizados com o equipamento Jeol JFC-1100E Ion Sputtering Device (Jeol, Tóquio, Japão) (Figura 5. 9).

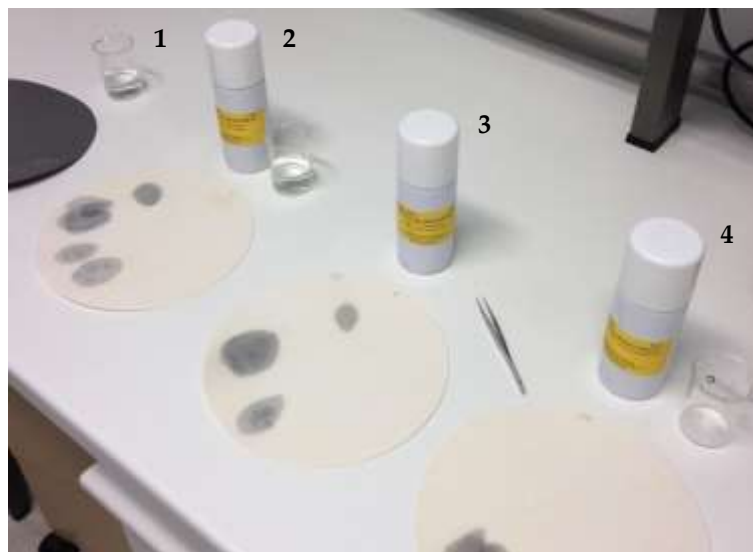


Figura 5. 8 – Fotografia do material usado no polimento dos espécimes para análise MEV. Sequência de lixas de granulometria 800, 1500 e 2500 sob refrigeração (1), seguido do polimento com pastas de diamante policristalinas de granulometria 3, 1 e 0,25 μm (2, 3 e 4, respetivamente), em panos de feltro para polimento.

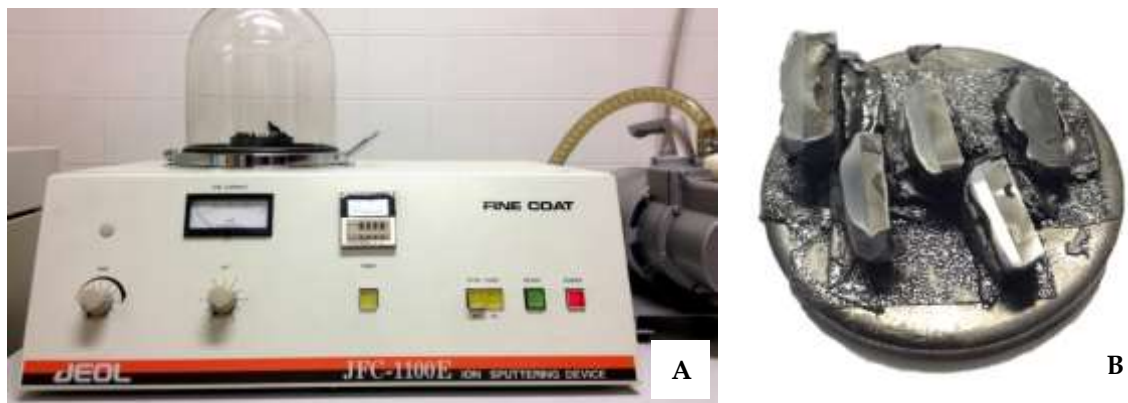


Figura 5. 9 – Fotografias de A) equipamento de metalização Jeol JFC-1100E Ion Sputtering Device (Jeol, Tóquio, Japão), Lab UICOB, FMDUL; B) espécimes acoplados a um *stub* após metalização.

5.5.2 Setup Experimental

O MEV utilizado foi um *Hitachi S-450* (Tóquio, Japão) (Figura 5. 10). Cada *stub* foi individualmente colocado na câmara de vácuo sujeito a parâmetros de aquisição que compreendiam uma fonte de alta tensão, responsável por acelerar os elétrons, com uma diferença de potencial de 20 kV, uma corrente do feixe de 200 μA , uma distância de trabalho¹⁴ de 2 mm e uma resolução espacial de 60 Å.

Foram obtidas fotografias através do *software* Esprit 1.8.2 (Bruker, Massachusetts, USA) de um espécime representativo de cada tipo de substrato, para cada estratégia de aplicação do sistema adesivo e cada período de envelhecimento, com ampliações de 500x, 1000x, 2000x e 5000x.

¹⁴ Distância entre a amostra e a objetiva



Figuras 5. 10 - Fotografias do Microscópio Eletrônico de Varrimento Hitachi S-450 (Tóquio, Japão), Lab Biomateriais, FMDUL.

5.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos do ensaio de Espetroscopia μ -Raman foram analisados estatisticamente com recurso ao *software SPSS*¹⁵ versão 23. Após a verificação de ausência de normalidade procedeu-se à análise através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney considerando diferenças estatisticamente significativas para $p^{16} < 0,05$.

5.6.1 Teste *U* de Mann-Whitney

O teste de Mann-Whitney permite averiguar se as medianas de duas variáveis aleatórias, X e Y , contínuas e independentes são iguais e assim aferir se estas foram ou não extraídas de uma população com a mesma mediana. Define-se como estatística de teste U , o número de vezes que cada valor da variável X é maior que um valor da variável Y , na população global e, se o valor de U tiver uma probabilidade associada não superior a p , rejeita-se a hipótese nula (H_0).

Por opção, definiram-se as variáveis dependentes DC e DD .

¹⁵ Do inglês *Statistical Package for the Social Sciences*

¹⁶ p -valor do teste bilateral, do inglês *Exact Sig. (2-tailed)*

5.6.1.1 Hipóteses de Estudo

As hipóteses de estudo dos resultados do ensaio de Espetroscopia μ -Raman são:

A. Avaliar diferenças no DC, a nível da interface de adesão criada entre o substrato dentinário são e material restaurador, por intermédio de um sistema adesivo universal, aplicada de acordo com as estratégias *ER* e *SE*, às 24 h:

Hipótese nula (H_0): não se verificaram diferenças no *DC* para as estratégias *ER* e *SE*;

Hipótese alternativa (H_1): verificaram-se diferenças no *DC* para as estratégias *ER* e *SE*.

B. Avaliar diferenças no DC, a nível da interface de adesão criada entre o substrato dentinário afetado e material restaurador, por intermédio de um sistema adesivo universal, aplicada de acordo com as estratégias *ER* e *SE*, às 24 h:

Hipótese nula (H_0): não se verificaram diferenças no *DC* para as estratégias *ER* e *SE*;

Hipótese alternativa (H_1): verificaram-se diferenças no *DC* para as estratégias *ER* e *SE*.

C. Avaliar diferenças no DD, a nível da interface de adesão criada entre o substrato dentinário são e material restaurador, por intermédio de um sistema adesivo universal, aplicada de acordo com as estratégias *ER* e *SE*, às 24 h:

Hipótese nula (H_0): não se verificaram diferenças no *DD* para as estratégias *ER* e *SE*;

Hipótese alternativa (H_1): verificaram-se diferenças no *DD* para as estratégias *ER* e *SE*.

D. Avaliar diferenças no DD, a nível da interface de adesão criada entre o substrato dentinário afetado e material restaurador, por intermédio de um sistema adesivo universal, aplicada de acordo com as estratégias *ER* e *SE*, às 24 h:

Hipótese nula (H_0): não se verificaram diferenças no *DD* para as estratégias *ER* e *SE*;

Hipótese alternativa (H_1): verificaram-se diferenças no *DD* para as estratégias *ER* e *SE*.

E. Avaliar diferenças no DC, a nível da interface de adesão criada entre o substrato dentinário são e material restaurador, por intermédio de um sistema adesivo universal, aplicada de acordo com as estratégias *ER* e *SE*, aos 6 M:

Hipótese nula (H_0): não se verificaram diferenças no *DC* para as estratégias *ER* e *SE*;

Hipótese alternativa (H_1): verificaram-se diferenças no *DC* para as estratégias *ER* e *SE*.

F. Avaliar diferenças no DC, a nível da interface de adesão criada entre o substrato dentinário afetado e material restaurador, por intermédio de um sistema adesivo universal, aplicada de acordo com as estratégias *ER* e *SE*, aos 6 M:

Hipótese nula (H_0): não se verificaram diferenças no *DC* para as estratégias *ER* e *SE*;

Hipótese alternativa (H_1): verificaram-se diferenças no *DC* para as estratégias *ER* e *SE*.

G. Avaliar diferenças no DD, a nível da interface de adesão criada entre o substrato dentinário são e material restaurador, por intermédio de um sistema adesivo universal, aplicada de acordo com as estratégias *ER* e *SE*, aos 6 M:

Hipótese nula (H_0): não se verificaram diferenças no *DD* para as estratégias *ER* e *SE*;

Hipótese alternativa (H_1): verificaram-se diferenças no *DD* para as estratégias *ER* e *SE*.

H. Avaliar diferenças no DD, a nível da interface de adesão criada entre o substrato dentinário afetado e material restaurador, por intermédio de um sistema adesivo universal, aplicada de acordo com as estratégias *ER* e *SE*, aos 6 M:

Hipótese nula (H_0): não se verificaram diferenças no *DD* para as estratégias *ER* e *SE*;

Hipótese alternativa (H_1): verificaram-se diferenças no *DD* para as estratégias *ER* e *SE*

6. Análise e Discussão de Resultados

No presente capítulo expõem-se os resultados do trabalho desenvolvido de acordo com a metodologia descrita no anterior, sendo estes discutidos à medida que são apresentados.

Os gráficos das Figuras 6. 1-6. 4 apresentam os conjuntos de espectros obtidos na zona da camada híbrida/interface adesiva dos espécimes de substratos são e afetado, analisados 24 h após o procedimento restaurador.

De acordo com a estratégia de aplicação do sistema adesivo *ER*, uma vez que é realizado um condicionamento ácido prévio do substrato, há remoção do componente mineral deste, começando por se observar o aparecimento do colagénio [bandas a 1245 cm^{-1} (C-N), 1450 cm^{-1} (CH_2) e 1667 cm^{-1} (C=O)], indicando que estamos em CH e, só posteriormente, praticamente na base da CH se começa a verificar o aparecimento da banda de fosfato ($\sim 960\text{ cm}^{-1}$) [5]. Segundo a estratégia *SE*, visto que não há remoção do componente mineral, a banda de fosfato aparece praticamente em simultâneo com o aparecimento das bandas do colagénio, ou seja, junto ao topo da CH.

Relativamente à espessura da CH, verificou-se que esta se revelou maior associada à estratégia *ER*, advindo do facto de nesta se usar ácido fosfórico, ao passo que na estratégia *SE*, os monómeros acídicos do sistema adesivo caracterizam-se por ter valores de pH superiores e, quanto maior for o ataque ácido (menor pH) ao substrato, maior será a profundidade de desmineralização [4][20][43]. Uma vez que a profundidade de desmineralização foi maior quando obtida pela estratégia *ER*, a probabilidade de existir também maior profundidade de impregnação da resina composta nas porosidades criadas é superior e, portanto, a CH resultante poderá ser mais espessa segundo esta estratégia. Estes resultados são corroborados por Santini e Miletic (2008) que verificaram que os sistemas adesivos *ER* proporcionavam maior desmineralização da dentina em comparação com os *SE*, embora estes últimos fossem os que apresentavam melhor e mais impregnação de adesivo [7]. De facto, de acordo com a estratégia *ER*, a impregnação da zona desmineralizada nem sempre ocorre em toda a sua espessura/profundidade, subsistindo uma zona de colagénio não suportado, sob a CH, suscetível a degradação; esta discrepância não é frequente nos sistemas adesivos *SE*.

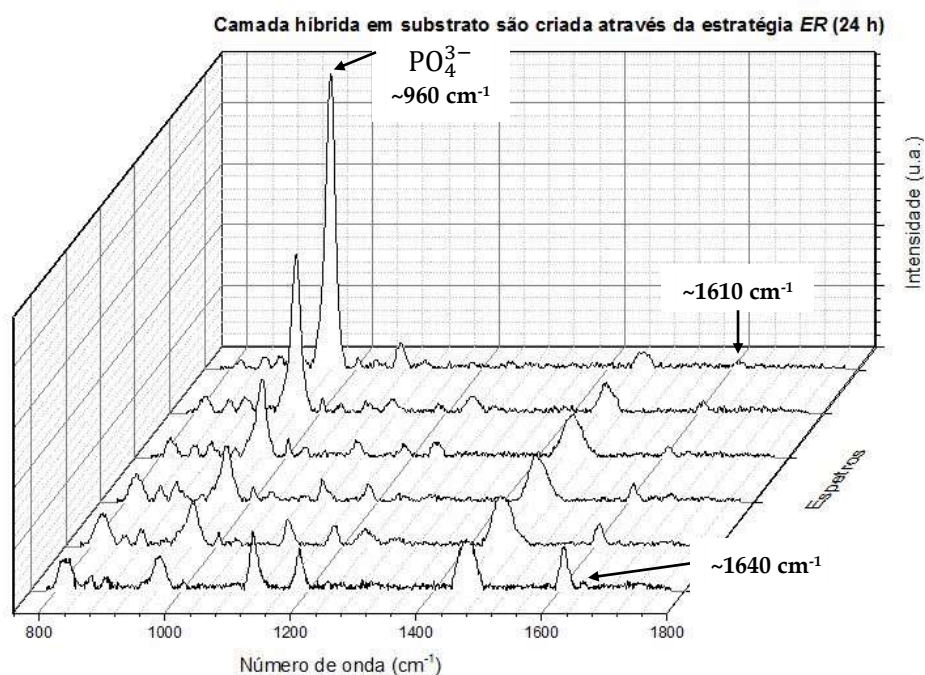


Figura 6. 1 – Comparação em *waterfall* dos espectros obtidos na zona da camada híbrida para o grupo SER-24, com identificação das bandas de interesse: ~960 cm⁻¹, ~1610 cm⁻¹ e ~1640 cm⁻¹.

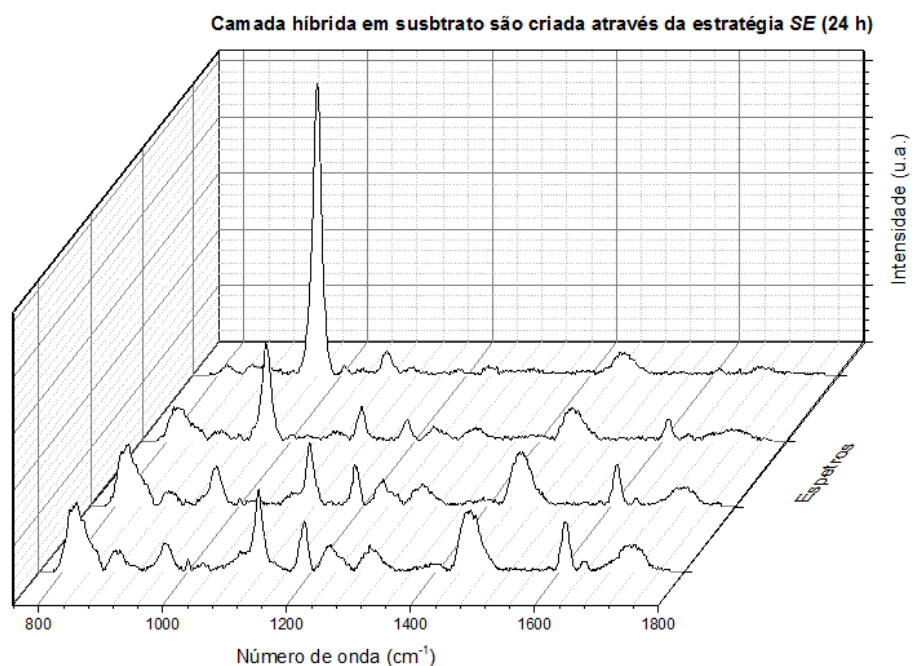


Figura 6. 2 – Comparação em *waterfall* dos espectros obtidos na zona da camada híbrida para o grupo SSE-24.

Relativamente ao substrato afetado, os resultados vão de encontro ao supracitado, i.e., verificou-se uma espessura maior da camada híbrida quando criada segundo a estratégia de aplicação do sistema adesivo ER (Figuras 6. 3 e 6. 4).

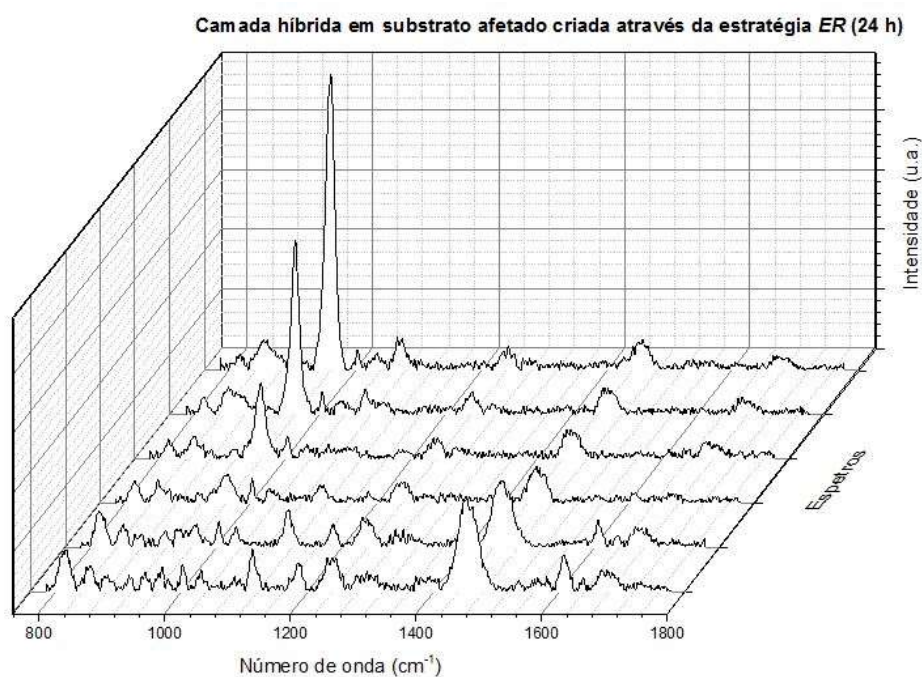


Figura 6. 3 – Comparação em *waterfall* dos espectros obtidos na zona da camada híbrida para o grupo AER-24.

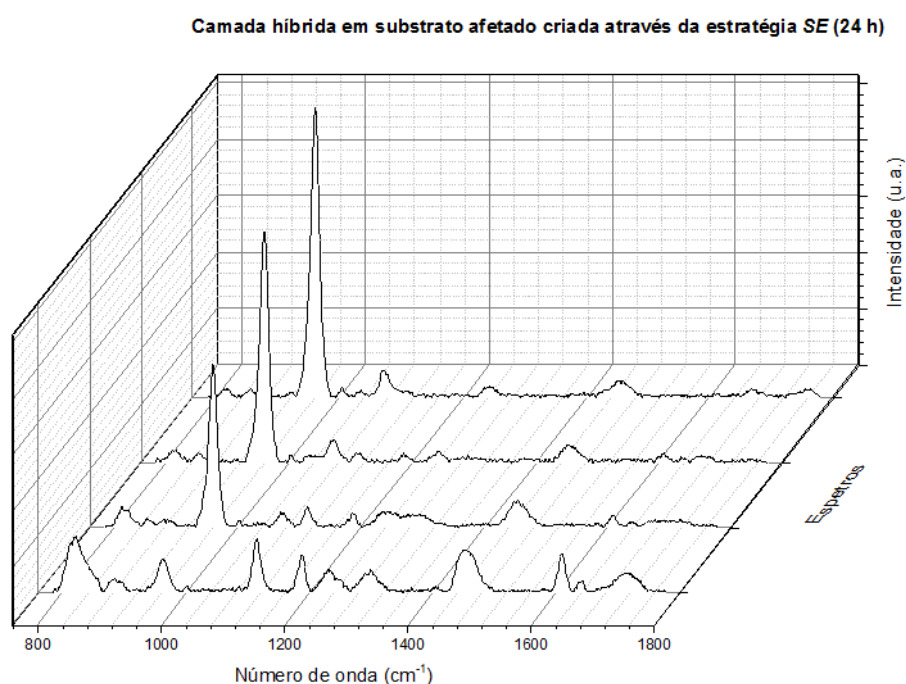
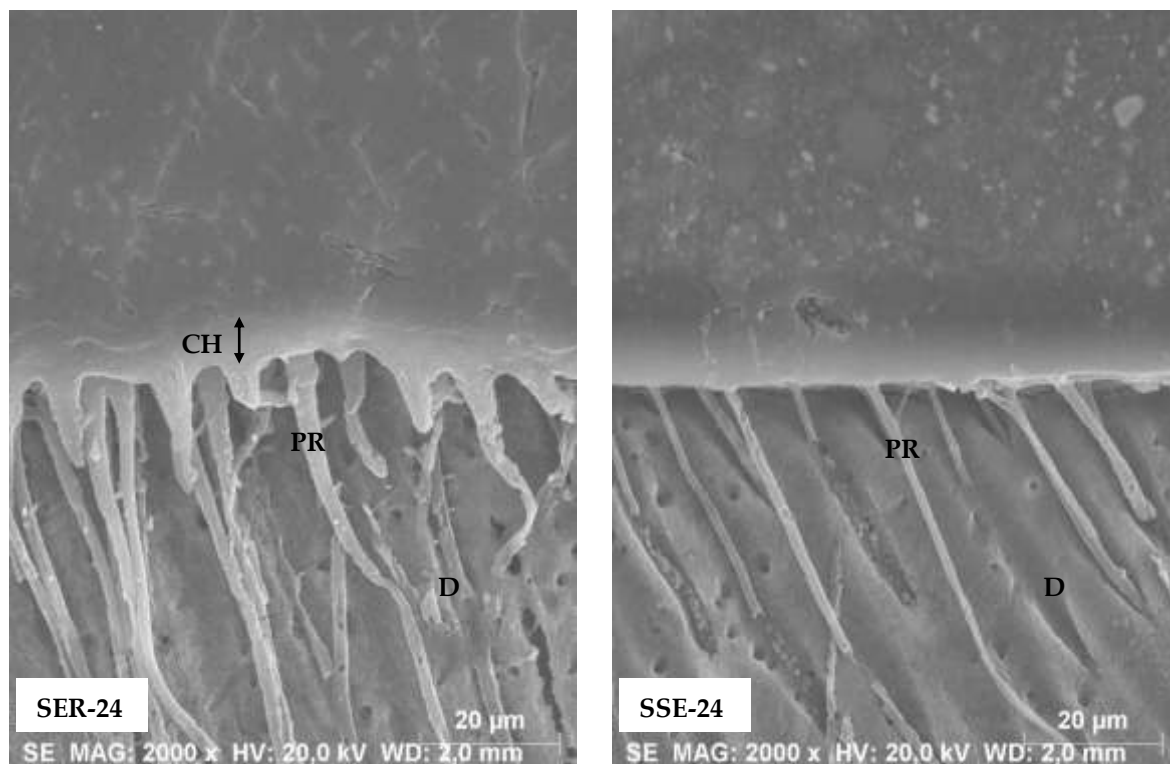


Figura 6. 4 – Comparação em *waterfall* dos espectros obtidos na zona da camada híbrida para o grupo ASE-24.

O mesmo pode concluir-se pela análise dos gráficos construídos para os espécimes de substratos são e afetado, analisados 6 M após o procedimento restaurador (Anexo III).

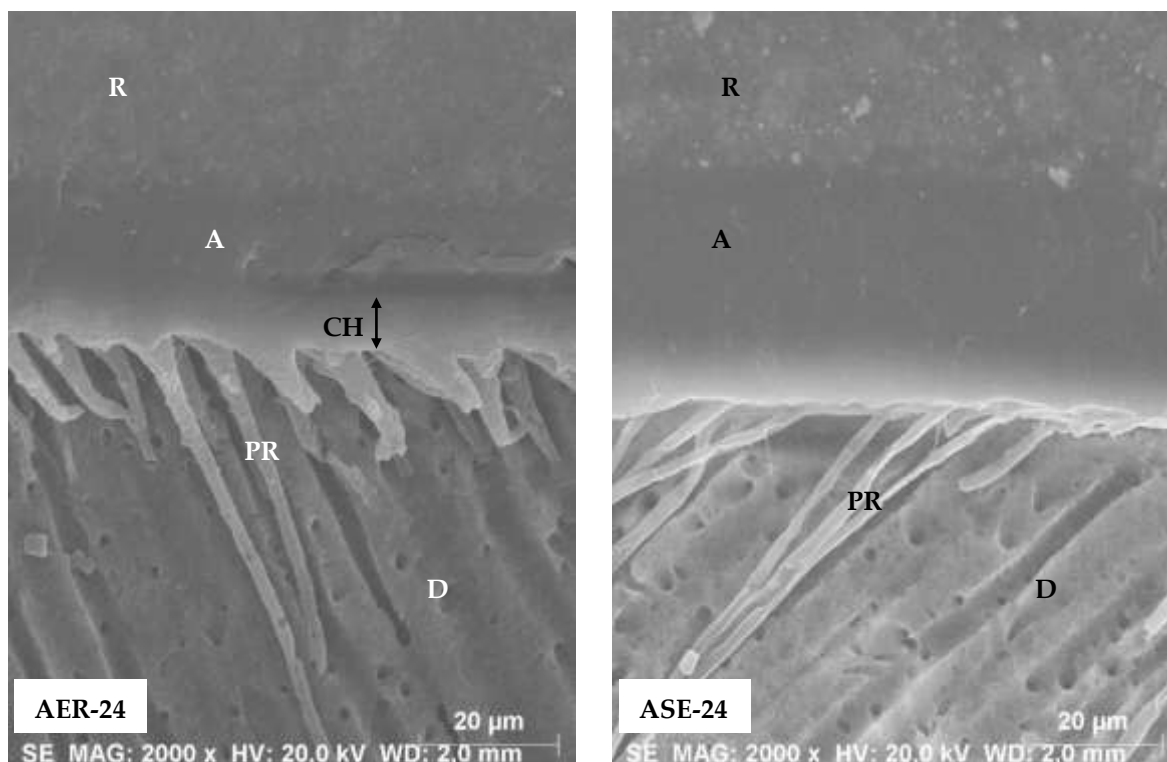
Embora a análise sob Espetroscopia μ -Raman seja mais precisa e fiável na indicação da desmineralização da dentina e subsequente infiltração dos monómeros do sistema adesivo que a realizada através de MEV, nas imagens obtidas por esta última foi possível visualizar diferenças morfológicas face às variantes estudadas neste projeto [69].

Das Figuras 6. 5 pode concluir-se que sob ambas as estratégias houve formação de prolongamentos resinosos no interior dos túbulos dentinários, acontecimento corroborado por Wang e Spencer (2001) [51], sendo que estes prolongamentos se manifestaram mais robustos para a estratégia *ER*. Também é possível observar que a interface adesiva criada por esta última é menos regular, mas de espessura relativamente constante, que a obtida pela estratégia *SE*. De facto, sob esta estratégia a camada híbrida revela-se quase impercetível face à obtida pela estratégia *ER*, que se exhibe com maior espessura.



Figuras 6. 5 – Imagens obtidas por MEV (2000x) da interface adesiva formada nos grupos SER-24 e SSE-24) (CH – camada híbrida, D – dentina (desmineralizada), PR – prolongamento resinoso).

A morfologia das interfaces criadas nos espécimes de substrato afetado, analisados 24 h após o procedimento restaurador, foi idêntica às obtidas em substrato são (Figuras 6. 6).



Figuras 6. 6 – Imagens obtidas por MEV (2000x) da interface adesiva formada nos grupos AER-24 e ASE-24 (CH – camada híbrida, D – dentina (desmineralizada), R – resina composta, A – adesivo, PR – prolongamento resinoso).

Para alguns espécimes criados em substrato são com um período de 6 M de envelhecimento verificou-se uma falha – *gap* – na interface adesiva, associada à estratégia *ER*, não tendo sido verificada na estratégia *SE*, o que está de acordo com a possível existência de uma zona desmineralizada e não impregnada suscetível a fenómenos de degradação por hidrólise, ao longo do tempo (Figura 6. 7). De facto, tem-se reportado que a qualidade da adesão se deteriora com o tempo, prejudicando a estabilidade da interface, com consequente falha; Breschi *et al.* (2008) e Munck *et al.* (2005) já o verificaram em apenas 6 M de envelhecimento, tanto sob condições *in vitro* ou *in vivo* [70][71]. Também por se tratar de um substrato histologicamente complexo (dentina) com maior conteúdo aquoso e permeável graças à sua estrutura tubular, a difusão de fluidos poderá estar na origem da dita rutura. Nakajima e Kunawarote (2011), Wang e Spencer (2008) e Yoshiyama *et al.* (2002) sugerem que, a nível tubular, a presença dos cristais ácido-resistentes pode bloquear uma adequada penetração dos monómeros adesivos e limitar a formação dos prolongamentos de resina pela dentina [9][72][73].

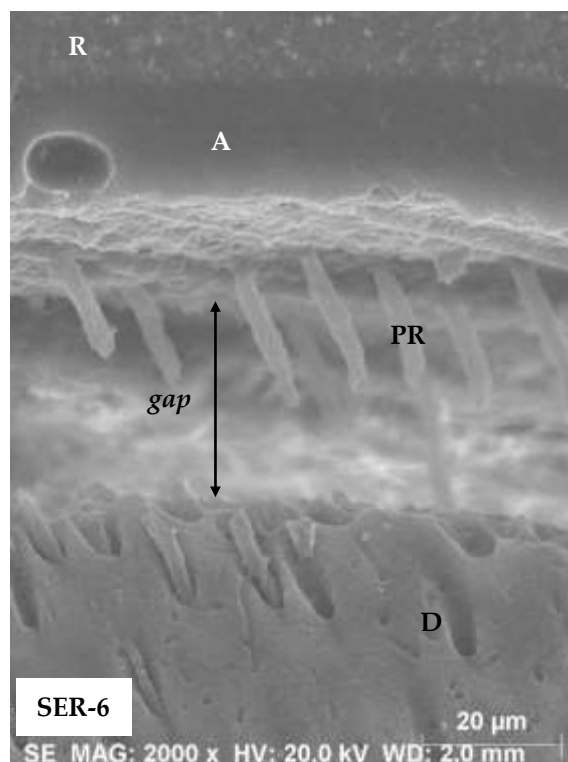


Figura 6. 7 - Imagem obtida por MEV (2000x) da interface adesiva formada no grupo SER-6). Observação de um *gap* na restauração e consequente exposição dos túbulos dentinários não impregnados pelo sistema adesivo (D – dentina (desmineralizada), R – resina composta, A – adesivo, PR – prolongamento resinoso).

As restantes imagens adquiridas por MEV podem ser consultadas no Anexo IV.

Nas Tabelas A.VI. 2 e AVI.4, através da Espetroscopia μ -Raman, podem ser lidos os valores obtidos para o *DD* para os dois tipos de substrato dentinário, sendo possível concluir que, de facto, em média, ocorreu uma maior profundidade de desmineralização, inclusive para além da CH, bem como os próprios valores do *DD* foram superiores para a estratégia *ER* quando comparados aos obtidos para a *SE*.

Os valores obtidos para o *DC* foram elevados ($DC \geq 78\%$) e transversais às variáveis em estudo, dando assim credibilidade ao uso deste sistema adesivo universal, principalmente, em dentina afetada por ser o substrato mais comum na prática clínica (Tabelas A.IV. 1 e A.IV. 3). A correta polimerização dos monómeros representa um passo importante no processo da adesão dentária e vários investigadores, Navarra *et al.* (2009) e Cadenaro *et al.* (2005), têm relacionado o aumento da permeabilidade da camada adesiva com a existência de polimerização incompleta do sistema adesivo [5][74]. Adicionalmente, em todos os grupos, os valores do *DC* variaram ao longo da interface, com valores mais baixos perto de dentina e altos junto do sistema adesivo.

Na Tabela A.V. 1 encontra-se *output* obtido para o teste estatístico de Mann-Whitney para os espécimes estudados.

Para o substrato são, 24 h após o procedimento restaurador, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as estratégias de aplicação, quer relativamente ao *DC* ($p=0,173$) quer ao *DD* ($p=0,408$) e o mesmo se confirmou para o *DC* nos espécimes com 6 M de envelhecimento. É de notar que para este último período de tempo será mais correto falar em “percentagem de monómero livre” em vez de “*DC*”, uma vez que é a quantidade de monómeros livres que efetivamente é medida e, ao fim desse tempo, não se consegue aferir se todo o restante monómero está ligado ou eluiu com o envelhecimento. Assim, para um tempo de envelhecimento de 6 M, face ao das 24 h, não se verificaram diferenças em termos de percentagem de monómero livre presente, relativamente ao tipo de estratégia aplicada em substrato são ($p=0,711$). Este resultado é satisfatório pois com o passar do tempo procuram-se valores constantes de percentagem de monómero livre, significando que este ainda permanece na interface não prejudicando as propriedades nem a permeabilidade da interface adesiva. Contrariamente, o *DD* relativo aos 6 M, revelou diferenças estatisticamente significativas entre estratégias ($p=0,045$). De facto, o valor da média do *DD* para o grupo SER-24 foi de $(5\pm 2)\times 10$ e para o grupo SSE-24 foi de $(3\pm 1)\times 10$, tendo-se verificado, novamente, maior desmineralização do substrato por parte da estratégia de aplicação *ER*.

Para o substrato afetado, o *DC* revelou-se estatisticamente semelhante para ambas as estratégias, às 24 h ($p=1,000$) e aos 6 M ($p=0,319$), não se traduzindo em diferenças entre as estratégias de aplicação do sistema adesivo. Não obstante, face ao *DD*, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas relativamente ao tipo de estratégia aplicada em substrato afetado, 24 h ($p=0,004$) e 6 M após o procedimento restaurador ($p=0,000$). De facto, o valor da média do *DD* para o grupo AER-24 foi de $(6\pm 1)\times 10$, enquanto que para o grupo ASE-24 foi de $(3\pm 1)\times 10$; para o grupo AER-6 foi de $(4\pm 1)\times 10$, enquanto que para o grupo ASE-6 foi de $(3\pm 1)\times 10$. Assim, em substrato afetado, a maior profundidade de desmineralização revelou-se estar associada à estratégia *ER*, independentemente do tempo de envelhecimento. Estes factos são corroborados por Nanci (2003) e Botelho (2015) que defendem que ao tratar-se de um substrato afetado por lesão de cárie, este apresenta uma matriz atubular distrófica – dentina terciária – e portanto mais porosa e hipomineralizada [16][25]. Estas características, naturalmente, favorecem a difusão do ácido ortofosfórico, condicionando uma maior desmineralização em profundidade e camadas híbridas de maior espessura, quando comparado com o que acontece em substrato são.

7. Considerações Finais e Perspetivas Futuras

O presente projeto de investigação tinha como objetivo primário o estudo da interface adesiva criada entre dois tipos de substrato dentinário e o material restaurador por intermédio de um sistema adesivo universal segundo as suas duas estratégias de aplicação, através do cálculo do *DC* do sistema adesivo ao longo da interface e do *DD* da dentina.

No presente capítulo apresentam-se as conclusões gerais do estudo e sugestões para desenvolvimentos futuros.

Os estudos na área da Dentisteria são maioritariamente realizados em dentes íntegros e neste projeto foi introduzida a variável tipo de substrato, tendo-se testado a adesão dentinária em substrato afetado por lesão de cárie, o mais comum na prática clínica.

Os resultados indicaram que houve diferenças na interface adesiva formada, pelo que fará sentido investir em mais estudos realizados neste tipo de substrato. Estas diferenças foram estatisticamente significativas para os espécimes de substrato são ($p=0,045$), mas ainda mais significativas para os de substrato afetado ($p\leq 0,004$), analisados 6 M após o procedimento restaurador, face ao *DD*. Foram rejeitadas as hipóteses nulas D, G e H.

Por outro lado, o facto dos valores médios do *DD*, para o substrato são, não terem sido coerentes ao longo do tempo, contrariamente ao expectável, poderá estar na base de um substrato falsamente julgado saudável ou mesmo por se terem usado espécimes diferentes nas medições das 24 h e dos 6 M, sendo estes aspetos a ter em conta em trabalhos futuros.

Relativamente ao *DC*, também seria interessante testar tempos de estudo superiores por forma a verificar a tendência observada, isto é, a percentagem de monómero livre presente na interface adesiva manteve-se constante face à variável tempo. Estes resultados, ainda que satisfatórios, neste projeto não seriam tão espectáveis pois, uma vez que se consideraram os valores médios de *DC* em cada interface analisada e, sendo estas interfaces mais espessas quando formadas pela estratégia *ER*, a atenuação nos valores de *DC* ao longo da interface é, geralmente, maior nestes casos. Assim, a média, obrigatoriamente, deveria descer, resultando em valores médios de *DC* menores, associados à estratégia *ER* e, portanto, verificar-se-ia uma maior oscilação nos valores do *DC* face às estratégias de aplicação, nas interfaces analisadas.

Através da técnica de Espetroscopia μ -Raman, nas zonas da interface adesiva em que foi reconhecida a existência do tal *gap*, ou onde se considerava que o substrato era dentina, tendo-se revelado aquando das medições ser esmalte, não foi possível obter dados espetrográficos, o que explica o facto de existirem campos por preencher nas Tabelas do Anexo VI.

Finalmente, as imagens obtidas por MEV foram coerentes com os resultados obtidos pela técnica de Espetroscopia μ -Raman.

Ao longo deste projeto foram reconhecidas limitações e, prontamente, propostas sugestões a fim de melhorar os resultados obtidos. Assim, num trabalho futuro investir-se-á em:

- Fazer o perfil espectral de uma lesão de cárie, desde a região cavitada até à sã, antes de realizar o procedimento restaurador;
- Identificar a idade do paciente a fim de saber que tipo de dentina se irá restaurar – terciária ou esclerótica – pois cada qual irá comportar-se de maneira diferente face ao procedimento restaurador aplicado;
- Aumentar o tempo de envelhecimento dos espécimes até à realização dos testes analíticos e utilizar o mesmo espécime nas medições aos diferentes períodos de envelhecimento, de forma a fazer-se uma leitura mais temporal e a manter-se invariável a natureza de substrato;
- Complementar o estudo com ensaios mecânicos de resistência adesiva.

8. Publicações

M. Oliveira, F. Chasqueira, M. L. Carvalho, J. P. Santos, S. Pessanha. (2016) “Raman and Scanning Electron Microscopies Application to the Analysis of Dentin-Composite Adhesives”. **Extended abstract** na revista Microscopy and Microanalysis como special issue da Conferência Internacional “Microscopy and Microanalysis in Materials and Life Sciences, 50th Meeting of the Portuguese Microscopy Society”, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, Universidade do Porto, 29-30 Junho 2016. <http://www.spmicros.pt/>.

M. Oliveira, F. Chasqueira, M. L. Carvalho, J. P. Santos, S. Pessanha. (2016) “Raman and Scanning Electron Microscopies Application to the Analysis of Dentin-Composite Adhesives”. **Poster** apresentado na Conferência Internacional “Microscopy and Microanalysis in Materials and Life Sciences, 50th Meeting of the Portuguese Microscopy Society”, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, Universidade do Porto, 29-30 Junho 2016. <http://www.spmicros.pt/>.

M. Oliveira, F. Chasqueira, S. Pessanha. (2016) “Comparison of the performance of two different dentin-composite adhesive application approaches using Raman spectroscopy”. **Poster** apresentado em “1st NOVA Biomedical Engineering Workshop”, FCT – NOVA, Campus da Caparica, 19-20 Maio 2016. <http://eventos.fct.unl.pt/webn/pages/home-page>.

M. Oliveira, F. Chasqueira, M. L. Carvalho, J. P. Santos, S. Pessanha. (2016) “Aplicação da Técnica de Microespectroscopia de Raman na Comparação da Interface Adesiva formada em Dentinas Sã e Afetada”. **Poster** apresentado em “20.^a Conferência Nacional de Física”, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 8-10 Setembro 2016. <https://eventos.spf.pt/FISICA2016/pt/>.

9. Referências Bibliográficas

- [1] “Ordem dos Médicos Dentistas”, *Cárie e Dentisteria* [Online]. Disponível em: <http://www.ond.pt/publico/carie-dentisteria>. [Acedido a: 15-Jan-2016].
- [2] G. da S. Delvan, “Sistemas Adesivos Dentinários”, Escola de Aperfeiçoamento Profissional, Associação Brasileira de Odontologia, 2001.
- [3] F. Chasqueira, S. Pessanha, M. L. Carvalho, J. Portugal, and S. Arantes-Oliveira, “Raman spectroscopy in dental research: analysis of the interface between dentin and direct composite restorations”, Lisboa, 2015.
- [4] A. R. R. Vinagre, “Avaliação Clínica e Laboratorial de Diferentes Sistemas Adesivos em Dentistaria Restauradora”, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2014.
- [5] C. Navarra, M. Cadenaro, B. Codan, A. Mazzoni, V. Sergo, D. S. D. E, and L. Breschi, “Degree of conversion and interfacial nanoleakage expression of three one-step self-etch adhesives”, *Eur. J. Oral Sci.*, no. 14, pp. 463–469, 2009.
- [6] M. de F. Borges, “Correlação entre Grau de Conversão e Resistência de União de Sistemas Adesivos Autocondicionantes”, Universidade Federal de Santa Maria, 2010.
- [7] A. Santini and V. Miletic, “Quantitative micro-Raman assessment of dentine demineralization , adhesive penetration , and degree of conversion of three dentine bonding systems”, *Eur. J. Oral Sci.*, pp. 177–183, 2008.
- [8] J. C. Ramos and A. Cavalheiro, “Adesão e Sistemas Adesivos”, in *Estética em Medicina Dentária*, Coimbra, 2009, pp. 15–29.
- [9] M. Nakajima, S. Kunawarote, T. Prasansuttiporn, and J. Tagami, “Bonding to caries-affected dentin”, *Jpn. Dent. Sci. Rev.*, vol. 47, no. 2, pp. 102–114, 2011.
- [10] “Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa”, *Mestrado*

- Integrado em Engenharia Biomédica* [Online]. Disponível em: <http://www.fct.unl.pt/ensino/curso/mestrado-integrado-em-engenharia-biomedica>. [Acedido a: 16-Jan-2016].
- [11] “Técnico de Lisboa”, *Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica* [Online]. Disponível em: <https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/cursos/mebiom>. [Acedido a: 16-Jan-2016].
- [12] J. D. S. e Castro, “Estudo dos efeitos do abuso de produtos de branqueamento no esmalte dentário”, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, 2015.
- [13] M. C. Madeira and R. J. C. Rizzolo, *Anatomia do Dente*, 7th ed. 2014.
- [14] J. Mondelli, *Proteção do Complexo Dentinopulpar*, 1st ed. Artes Médicas, 1998.
- [15] C. Gonçalves and V. Bairos, “Aparelho Digestivo - Cavidade Oral”, in *Histologia*, 3rd ed., Imprensa da Universidade de Coimbra, Ed. Coimbra, 2010, pp. 206–209.
- [16] A. Nanci, “Structure of the Oral Tissues”, in *Ten Cate’s Oral Histology*, 6th ed., Mosby Hardcover, 2003, pp. 1–3.
- [17] V. H. R. Lima, “Composição Química do Dente”, 2010 [Online]. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/noysy90/composio-qumica-do-dente>. [Acedido a: 26-Jun-2016].
- [18] The Editors of Encyclopædia Britannica, “Encyclopædia Britannica, Inc”, *Tooth Anatomy*, 2013 [Online]. Disponível em: <https://www.britannica.com/science/tooth-anatomy>. [Acedido a: 15-Feb-2016].
- [19] Y. Zou, S. R. Armstrong, and J. L. P. Jessop, “Quantitative analysis of adhesive resin in the hybrid layer using Raman spectroscopy”, *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 94, no. 1, pp. 288–97, 2010.
- [20] V. M. B, K. Yoshihara, Y. Yoshida, A. Mine, D. M. J, and V. L. K. L, “State of the art of self-etch adhesives”, *Dent. Mater.*, vol. 27, no. 1, pp. 17–28, 2011.
- [21] S. C. C. Garcia, “Bases Químicas da Formação e Erupção Dentária”, Universidade do Porto, 2014.
- [22] A. Lopes, B. Mouzinho, L. Lysle, R. Machado, and V. Sena, “Histologia do Esmalte, Dentina, Polpa e Cimento”, 2014 [Online]. Disponível em:

- <http://pt.slideshare.net/rafa12071/histologia-do-esmalte-dentina-polpa-e-cimento>. [Acedido a: 26-Jun-2016].
- [23] C. P. T. Mantovani, “Análise das Propriedades Físicas e Químicas da Dentina de Dentes Decíduos e Permanentes - Estudo in Vitro”, Universidade de São Paulo, 2011.
- [24] G. S. de Assis, “Dentinogênese”, 2012 [Online]. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/grazielleassis37/dentinogenese>. [Acedido a: 26-Jun-2016].
- [25] J. T. da S. Botelho, “O Dente como Método Orgânico de Cultura in Situ de Odontoblastos: Avaliação Histomorfológica”, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2015.
- [26] E. A. Balestrin, “Dentina: relação entre densidade tubular em diferentes profundidades e a resistência ao cisalhamento de quatro diferentes sistemas adesivos”, Universidade de São Paulo, 2009.
- [27] “Resumo: Dentinogênese - Estudante de Odontologia” [Online]. Disponível em: <http://www.estudanteodontologia.com.br/index.php/2015/08/03/resumo-dentinogenese/>. [Acedido a: 23-Jun-2016].
- [28] “Pocket Dentistry - Fundamental Concepts of Enamel and Dentin Adhesion”, 2015 [Online]. Disponível em: <http://pocketdentistry.com/4-fundamental-concepts-of-enamel-and-dentin-adhesion/>. [Acedido a: 19-Jul-2016].
- [29] F. Mandarino, “Adesivos Odontológicos”, 2003 [Online]. Disponível em: <http://143.107.206.201/restauradora/dentistica/temas/adesivos/adesivos.htm>. [Acedido a: 16-Feb-2016].
- [30] A. B. do Valle, “Complexo Dentina-Polpa”, 2015 [Online]. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/andreadovalle94/complexo-dentina-polpa>. [Acedido a: 26-Jun-2016].
- [31] C. D. Hatrick, W. S. Eakle, and W. F. Bird, *Dental Materials: Clinical Applications for Dental Assistants and Dental Hygienists*, 2nd ed. São Francisco: Saunders Elsevier, 2011.
- [32] T. A. Donassollo, A. R. Romano, F. F. Demarco, and Á. Della-Bona, “Avaliação da Microdureza Superficial do Esmalte e da Dentina de Dentes Bovinos e Humanos (Permanentes e Decíduos)”, *Revista Odonto Ciência*, Porto Alegre, pp. 311–316, 2007.

- [33] J. Marcelo, F. De Medeiros, E. S. Naregi, E. T. Dias, C. De Almeida, C. Frederico, D. A. Von Dollinger, and L. Carlos, “Medidas de Dureza Vickers na Superfície de Blocos de Resina Fenólica com Canis Endodônticos Simulados”, *UEPG Ciências Biológicas e da Saúde*, Ponta Grossa, pp. 53–71, 2014.
- [34] N. H. Fares, H. N. Filho, I. B. Pacheco, K. Q. Coutinho, and H. D. Nagem, “Resistência Flexural e Módulo de Elasticidade da Resina Composta”, *Revista de Clínica e Pesquisa Odontológica*, vol. 2, no. 1, pp. 53–55, 2005.
- [35] L. Bachmann and D. M. Zezell, *Estrutura e Composição do Esmalte e da Dentina*. Livraria da Física, 2005.
- [36] J. Park, J. Eslick, Q. Ye, A. Misra, and P. Spencer, “The influence of chemical structure on the properties in methacrylate-based dentin adhesives”, *Dent. Mater.*, vol. 27, no. 11, pp. 1086–1093, 2011.
- [37] G. Terra, “Cárie com interesse à Dentística”, 2011 [Online]. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/profguilhermeterra/crie-com-interesse-dentistica>. [Acedido a: 26-Jun-2016].
- [38] A. Coelho, J. P. Canta, J. N. R. Martins, S. A. Oliveira, and P. Marques, “Perspetiva histórica e conceitos atuais dos sistemas adesivos amelodentinários – revisão da literatura”, *Rev. Port. Estomatol. Med. Dentária e Cir. Maxilofac.*, vol. 3, no. 1, pp. 39–46, 2016.
- [39] A. Sezinando, “Looking for the ideal adhesive - A review”, *Rev. Port. Estomatol. Med. Dent. e Cir. Maxilofac.*, vol. 55, no. 4, pp. 194–206, 2014.
- [40] H. N. Filho, N. H. Fares, C. T. Fiuza, H. D. Nagem, M. Guerino, and P. Couto, “Sistemas adesivos – classificação”, *Full Dent. Sci.*, vol. 5, no. 20, pp. 641–646, 2014.
- [41] G. C. Martins, A. P. G. de O. Franco, E. de P. Godoy, J. C. Gomes, and O. M. M. Gomes, “Adesivos Dentinários”, *Revista Gaúcha de Odontologia*, Porto Alegre, pp. 429–436, 2008.
- [42] M. G. Buonocore, “A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces”, *J. Dent. Res.*, vol. 34, no. 6, pp. 849–53, 1955.
- [43] D. H. Pashley, F. R. Tay, L. Breschi, L. Tjäderhane, R. M. Carvalho, M. Carrilho, and A. Tezvergil-mutluay, “State of the art etch-and-rinse adhesives”, *Dent. Mater.*, no. 27, pp. 1–16, 2011.

- [44] M. Giannini, P. Makishi, A. P. A. Ayres, P. M. Vermelho, B. M. Fronza, T. Nikaido, and J. Tagami, "Self-Etch Adhesive Systems: A Literature Review", *Brazilian Dent. J.*, vol. 1, no. 26, pp. 3–10, 2015.
- [45] N. A. De Oliveira, L. Shitomi, M. Diniz, P. Henrique, P. D. Alpino, C. Aparecida, and C. Coimbra, "Sistemas Adesivos: Conceitos Atuais e Aplicações Clínicas", *Rev. Dentística*, no. 19, pp. 6–14, 2010.
- [46] K. J. Anusavice, C. Shen, and H. R. Rawls, *Phillips Materiais Dentários*, 12th ed. Gainesville, Florida, 2013.
- [47] G. Paganotto, F. H. C. de Souza, and L. M. Campos, "Resistência de União da Resina Composta em Dentina", *Rev. Gaucha Odontol.*, vol. 51, no. 3, pp. 149–153, 2003.
- [48] J. Castro, J. Godinho, A. Mata, J. M. Silveira, and S. Pessanha, "Study of the effects of unsupervised OTC whitening products in dental enamel using μ -Raman and μ -EDXRF spectroscopies", *J. Raman Spectrosc.*, vol. 47, no. 4, pp. 444–448, 2016.
- [49] J. Silveira, S. Longelin, A. Mata, and Carvalho, "Identification of oxygen in dental enamel following tooth bleaching using confocal micro Raman spectroscopy", vol. 43, pp. 1089–1093, 2012.
- [50] P. Spencer, Y. Wang, M. P. Walker, D. M. Wieliczka, and J. R. Swafford, "Interfacial Chemistry of the Dentin / Adhesive Bond", *J. Dent. Res.*, vol. 79, no. 7, pp. 1458–1463, 2000.
- [51] Y. Wang and P. Spencer, "Quantifying adhesive penetration in adhesive / dentin interface using confocal Raman microspectroscopy", *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 59, no. 1, pp. 46–55, 2001.
- [52] V. Hass, M. Dobrovolski, C. Zander-Grande, G. C. Martins, L. A. A. Gordillo, M. D. L. R. Accorinte, O. M. M. Gomes, A. D. Loguercio, and A. Reis, "Correlation between degree of conversion , resin – dentin bond strength and nanoleakage of simplified etch-and-rinse adhesives", *Dent. Mater.*, vol. 29, no. 9, pp. 921–928, 2013.
- [53] B. A. Dedavid, C. I. Gomes, and G. Machado, "Microscopia Eletrônica de Varredura - Materiais poliméricos, metálicos e semicondutores", Porto Alegre, 2007.
- [54] M. Sato and M. Miyazaki, "Comparison of depth of dentin etching and resin infiltration with single-step adhesive systems", *J. Dent.*, vol. 33, pp. 475–484, 2005.

- [55] D. C. S. Farias, “Avaliação de Sistemas Adesivos Universais na Dentina sob Testes de Microtração e Espectroscopia Micro-Raman”, Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.
- [56] M. R. da C. Pereira, “Fotofísica de Porfirinas e Ftalocianinas em Matrizes de TiO₂ preparadas pelo método de Sol - Gel”, Universidade do Minho, 2004.
- [57] R. L. McCreery, *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. Columbus, Ohio: John Wiley & Sons, Inc, 2000.
- [58] A. S. P. S. Moreno, “Non-Destructive Characterization of Artworks in Paper Support using Spectroscopy Techniques”, Universidade de Lisboa, 2013.
- [59] R. A. Bitar, “Espectroscopia Micro-Raman Aplicada para o Diagnóstico do Melanoma Cutâneo”, Universidade Federal de São Paulo, 2009.
- [60] C. University, “IR Spectroscopy”, 2007 [Online]. Disponível em: http://www.columbia.edu/cu/chemistry/ugrad/hssp/EXP_7.html. [Acedido a: 11-Jul-2016].
- [61] J. G. Leite, “Aplicação das Técnicas de Espectroscopia FTIR e de Micro Espectroscopia Confocal Raman à Preservação do Património”, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2008.
- [62] P. Klauss, “Estudo da Obtenção de Imagens no Microscópio Eletrônico de Varredura e Espectros na Microanálise por Energia Dispersiva”, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- [63] P. R. Barbaroto, “Microscópio Eletrônico de Varredura - Medidas para Caracterização e Análise de Materiais”.
- [64] “Geochemical Instrumentation and Analysis - Scanning Electron Microscopy (SEM)”, 2016 [Online]. Disponível em: http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html. [Acedido a: 15-Jul-2016].
- [65] H. S. Mansur, “Técnicas de Caracterização de Materiais”, in *Biomateriais*, Minas Gerais, 2016.
- [66] A. M. Maliska, “Microscopia Eletrônica de Varredura” [Online]. Disponível em: http://www.usp.br/nanobiodev/wp-content/uploads/MEV_Apostila.pdf. [Acedido

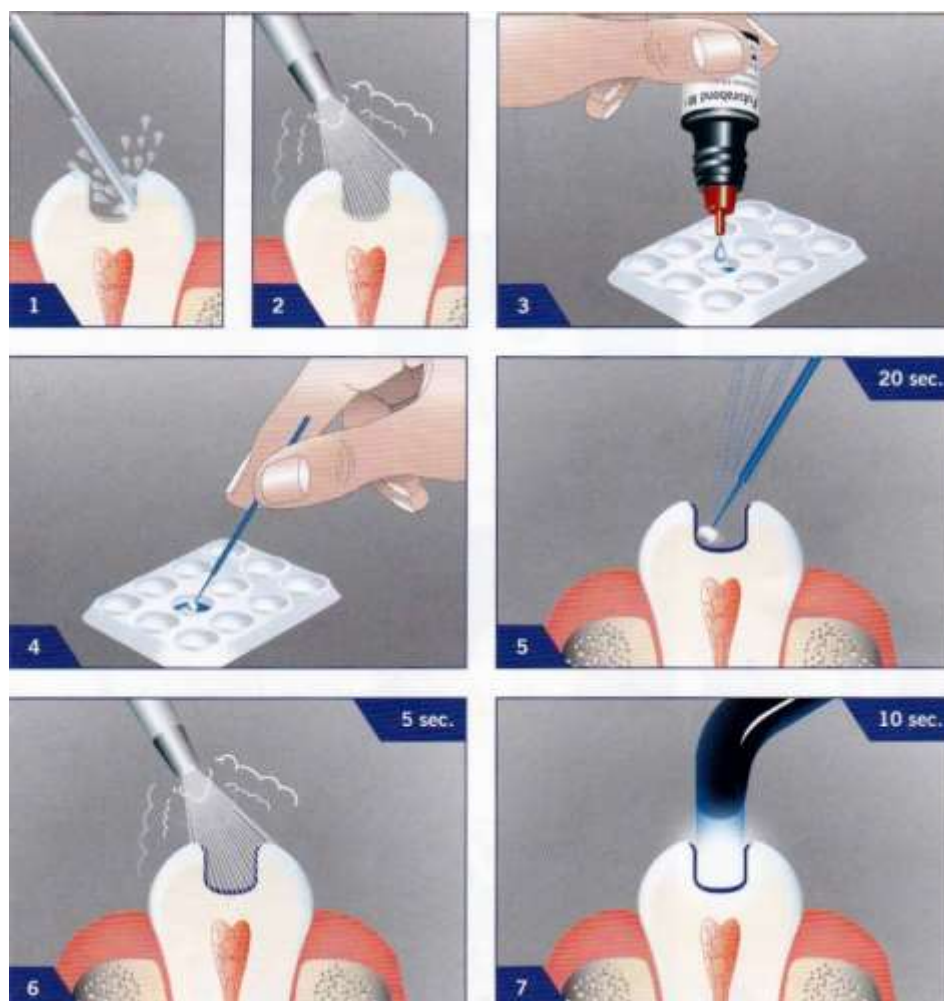
a: 15-Jul-2016].

- [67] J. I. Goldstein, D. E. Newbury, J. W. Colby, H. Yakowitz, E. Lifshin, and J. R. Coleman, *Practical Scanning Electron Microscopy: Electron and Ion Microprobe Analysis*. New York, 1975.
- [68] H. Anderson, "Microscope Master - Research, Reviews and Comparisons", *Scanning Electron Microscope*, 2010 [Online]. Disponível em: <http://www.microscopemaster.com/scanning-electron-microscope.html>. [Acedido a: 15-Jul-2016].
- [69] A. Santini and V. Miletic, "Comparison of the hybrid layer formed by Silorane adhesive, one-step self-etch and etch and rinse systems using confocal micro-Raman spectroscopy and SEM", *J. Dent.*, vol. 36, no. 9, pp. 683–691, 2008.
- [70] L. Breschi, A. Mazzoni, A. Ruggeri, M. Cadenaro, R. Di Lenarda, and E. De Stefano Dorigo, "Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface", *Dent. Mater.*, vol. 24, no. 1, pp. 90–101, 2008.
- [71] J. De Munck, K. Van Landuyt, M. Peumans, A. Poitevin, P. Lambrechts, M. Braem, and B. Van Meerbeek, "A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results", *J. Dent. Res.*, vol. 84, no. 1, pp. 118–32, 2005.
- [72] Y. Wang, P. Spencer, and M. P. Walker, "Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy", vol. 81, no. 2, pp. 279–286, 2008.
- [73] M. Yoshiyama, F. R. Tay, J. Doi, Y. Nishitani, T. Yamada, K. Itou, R. M. Carvalho, M. Nakajima, and D. H. Pashley, "Bonding of self-etch and total-etch adhesives to carious dentin", *J. Dent. Res.*, vol. 81, no. 8, pp. 556–560, 2002.
- [74] M. Cadenaro, F. Antoniolli, S. Sauro, F. Tay, R. Di Lenarda, C. Prati, M. Biasotto, L. Contardo, and L. Breschi, "Degree of conversion and permeability of dental adhesives", *Eur. J. Oral Sci.*, vol. 113, pp. 525–530, 2005.

Anexo I

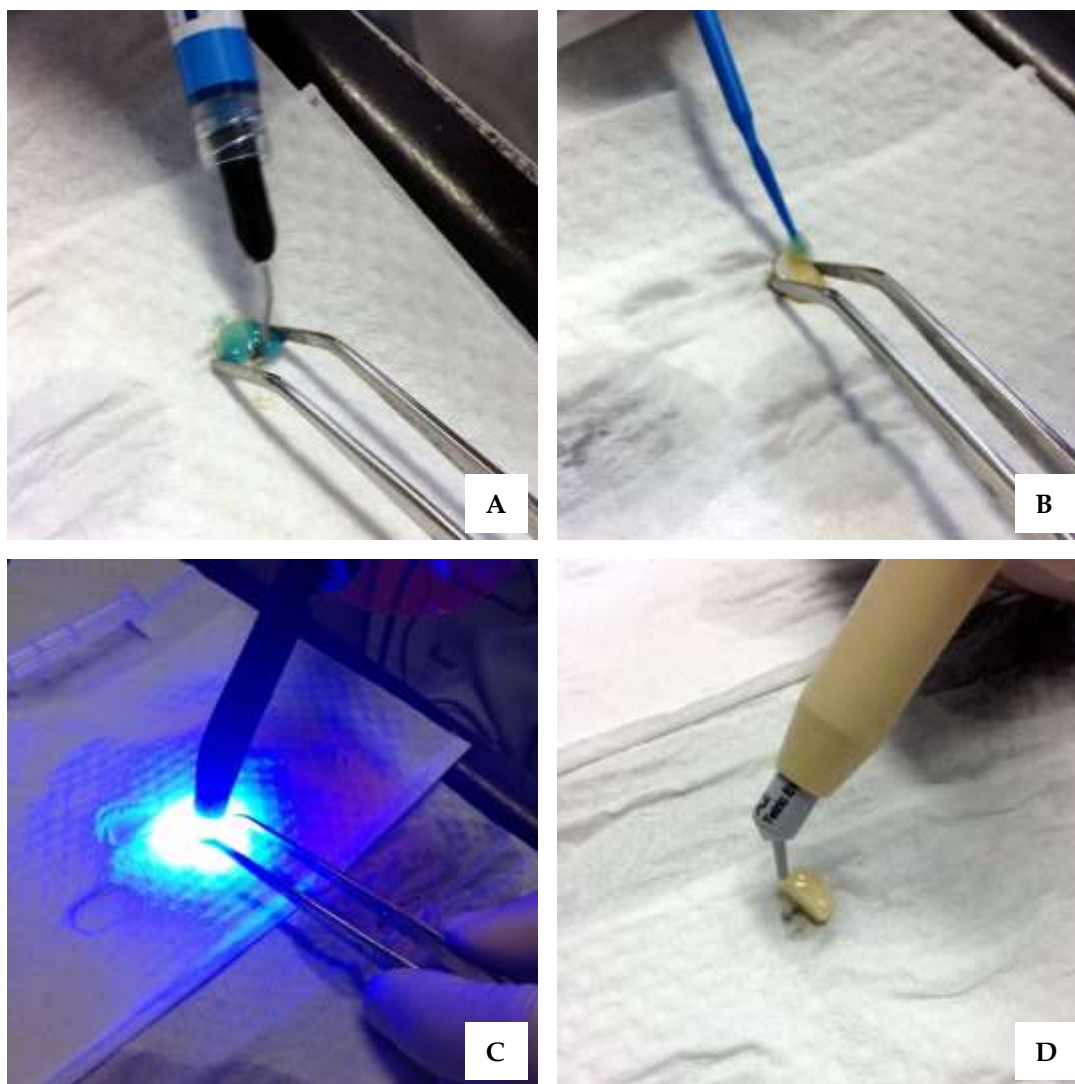
Tabela A.I. 1 – Componentes e composição (%) do sistema adesivo universal Futurabond M+ e da resina composta Tetric EvoFlow utilizados no presente estudo.

Material	Componentes	%
Sistema adesivo universal Futurabond M+	HEMA	10-25%
	Bis-GMA	10-25%
	Etanol	10-25%
	Monómeros acídicos	2,5-5-%
	UDMA	2,5-5-%
	Catalisador ($\leq 2,5\%$)	$\leq 2,5\%$
	Ácido silícico pirogénico (dióxido de silício)	$\leq 2,5\%$
Resina composta Tetric EvoFlow	Bis-GMA,	
	UDMA	
	Decanodioldimetacrilato	37,6%
	Mistura de óxidos	
	Sílica	41,1%
	Pré-polímeros	20,4%
	Aditivos, catalisadores e estabilizadores	0,9%
	Pigmentos	< 0,01%



- Aplicar o adesivo, friccionando-o sobre a superfície do substrato dentinário durante 20 seg;
- Expor a uma corrente de ar suave durante 5 seg;
- Polimerizar com luz LED durante 10 seg.

Figura A.II. 1 – Protocolo de aplicação do sistema adesivo universal Futurabond M+ segundo as instruções do fabricante.



Figuras A.II. 2 – Fotografias tiradas aquando do procedimento experimental: A) aplicação do ácido fosfórico Vococid, no caso da estratégia *ER*; B) aplicação do sistema adesivo universal Futurabond M+; C) polimerização por ativação com fonte luminosa (400-500nm); D) restauração com resina composta Tetric EvoFlow e finalização com repetição do passo de polimerização.

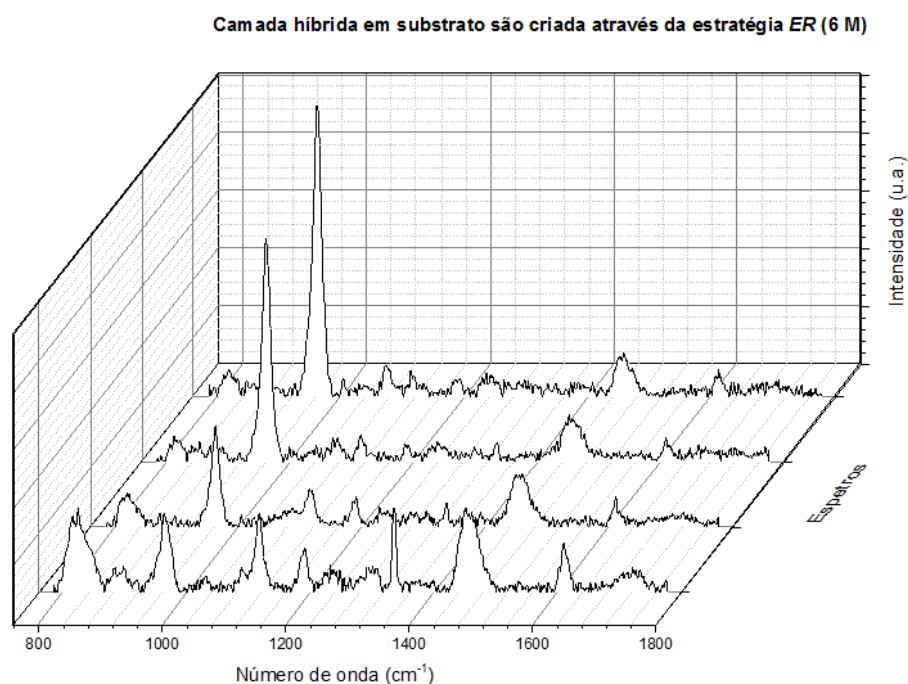


Figura A.III. 1 – Comparação em *waterfall* dos espectros obtidos na zona da camada híbrida para o grupo SER-6.

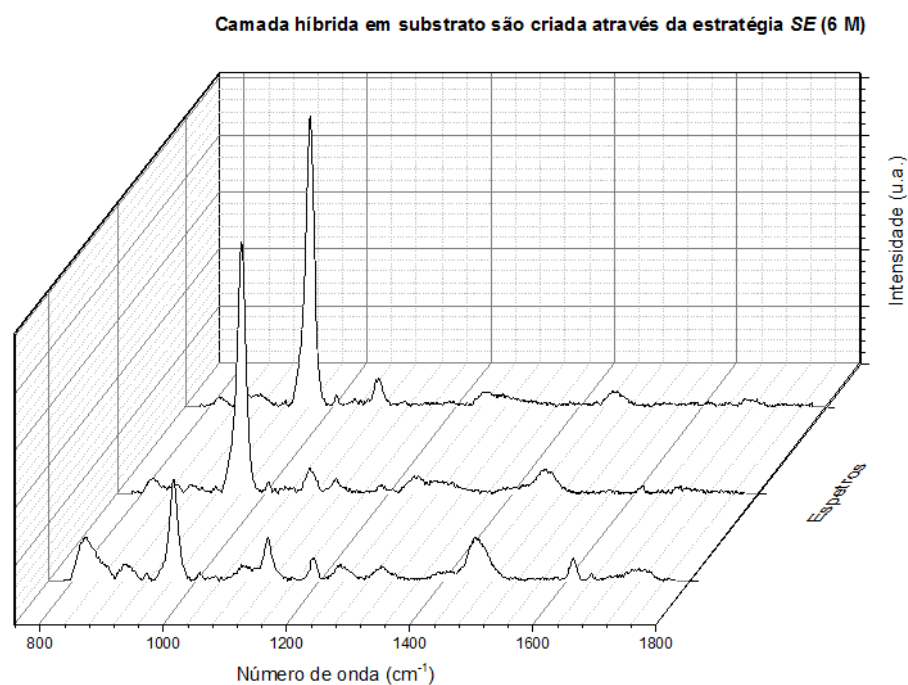


Figura A.III. 2 – Comparação em *waterfall* dos espectros obtidos na zona da camada híbrida para o grupo SSE-6.

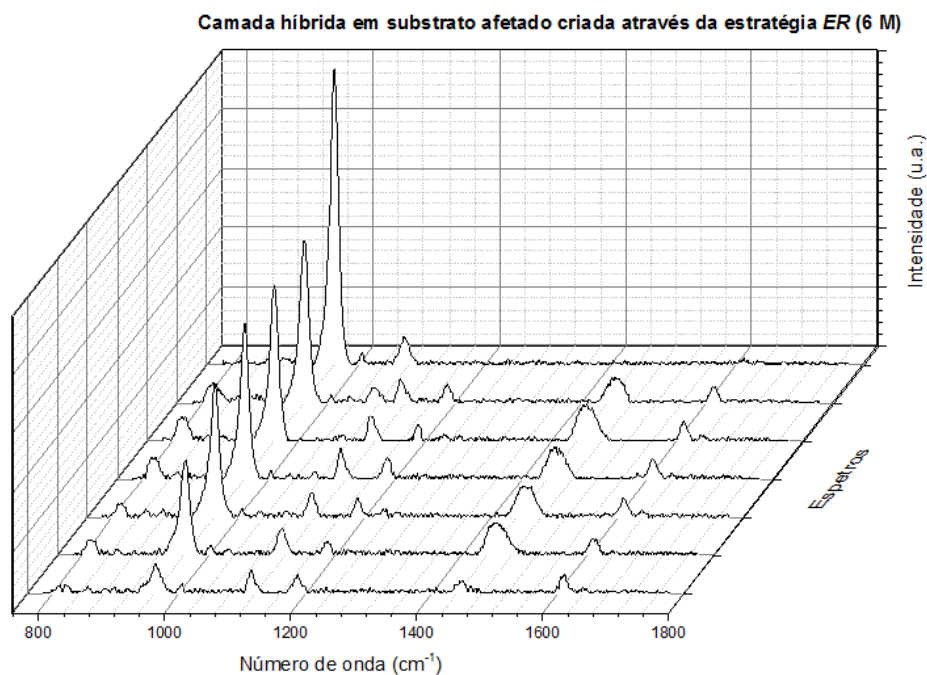


Figura A.III. 3 – Comparação em *waterfall* dos espectros obtidos na zona da camada híbrida para o grupo AER-6.

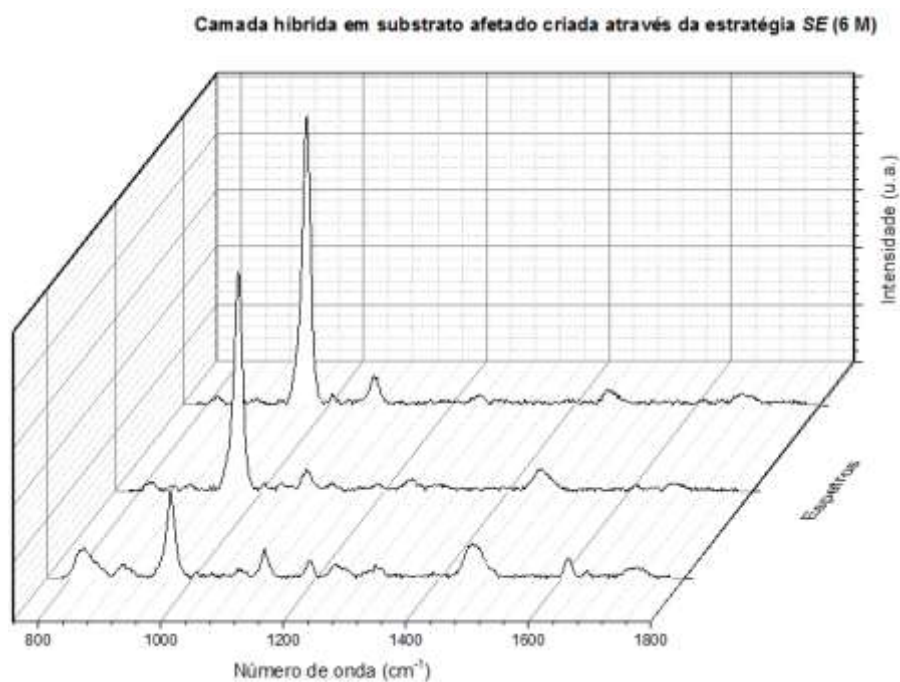
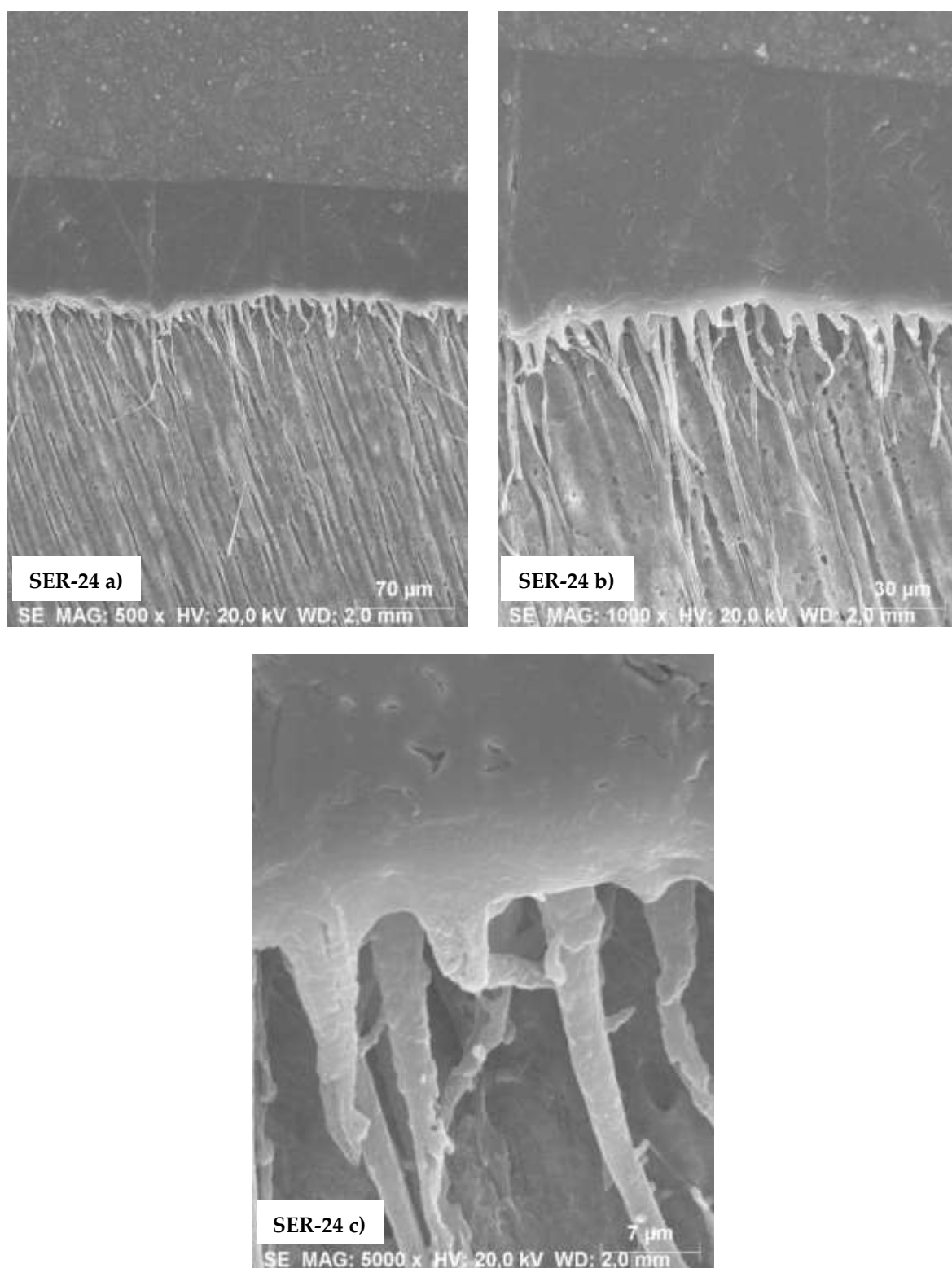
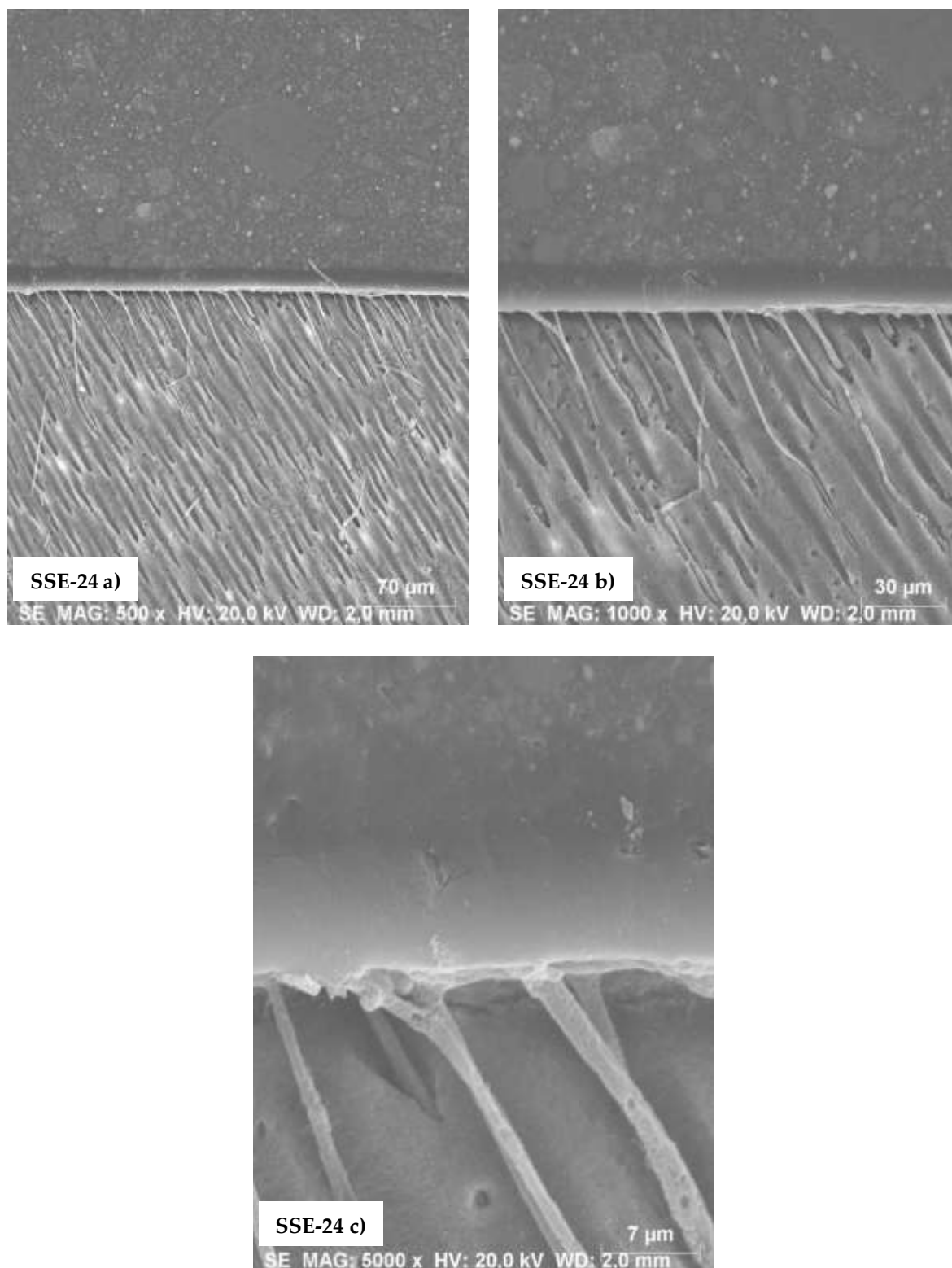


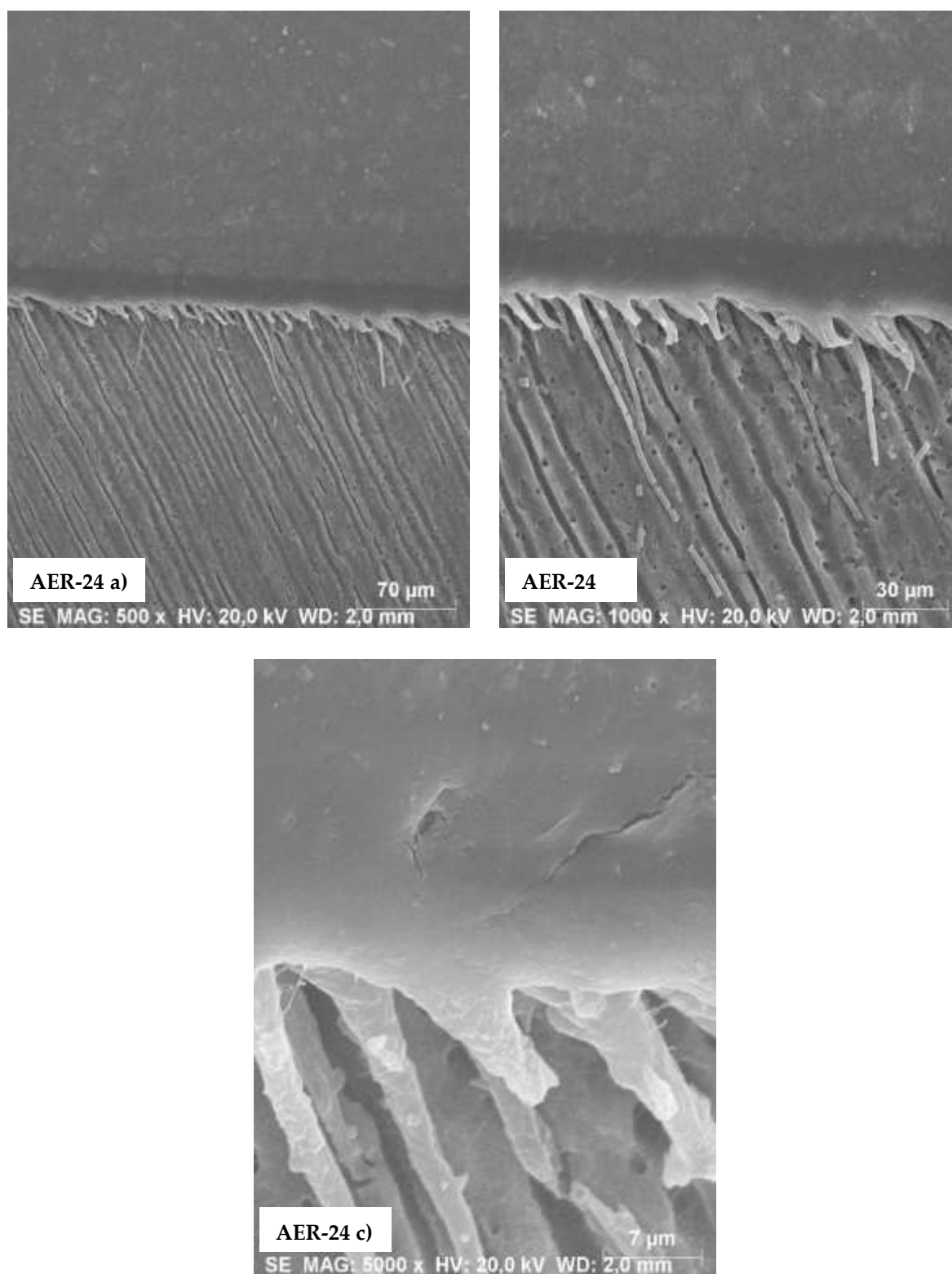
Figura A.III. 4 – Comparação em *waterfall* dos espectros obtidos na zona da camada híbrida para o grupo ASE-6.



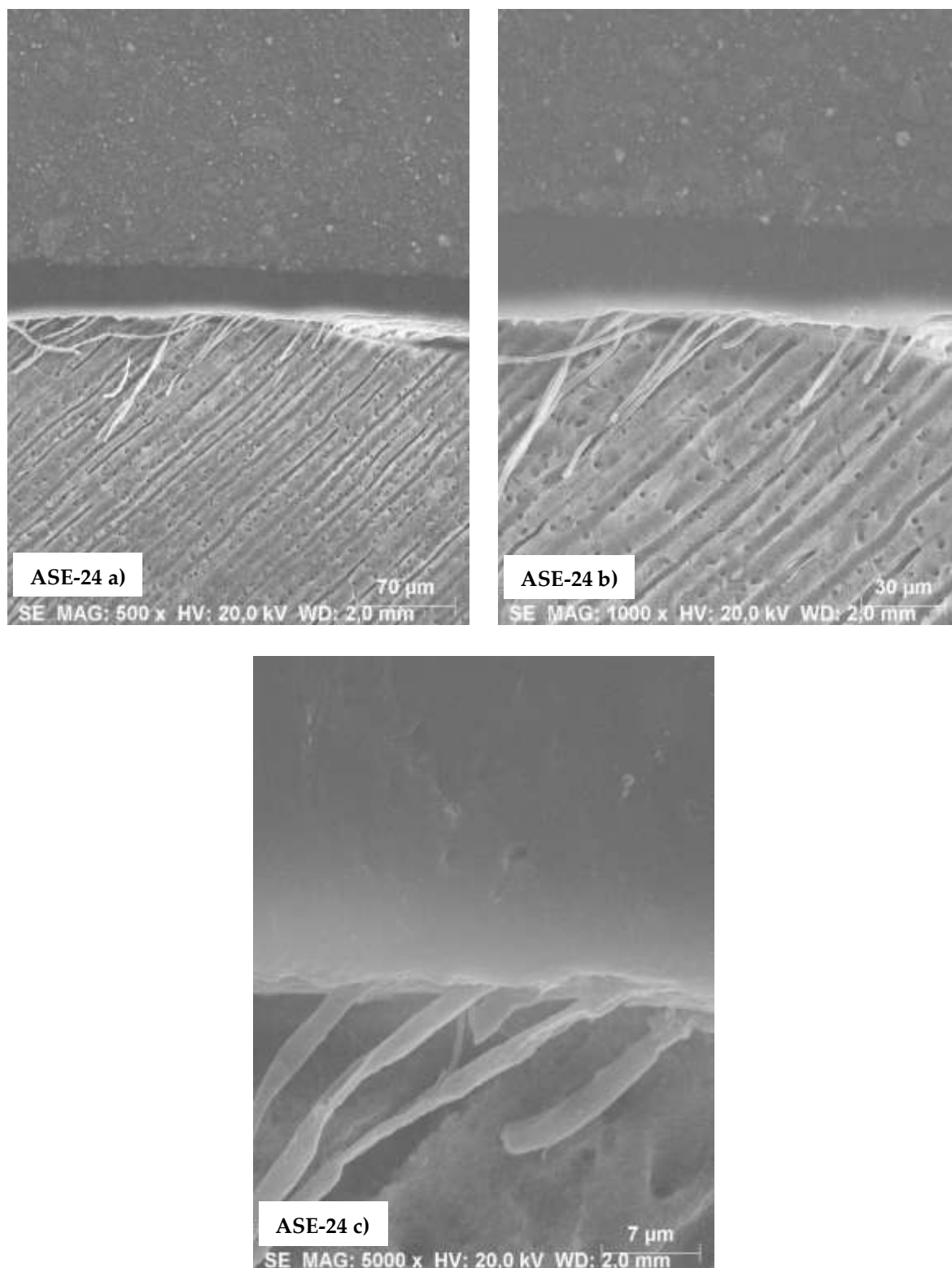
Figuras A.IV. 1 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo SER-24 com ampliações a) 500x, b) 1000x, c) 5000x.



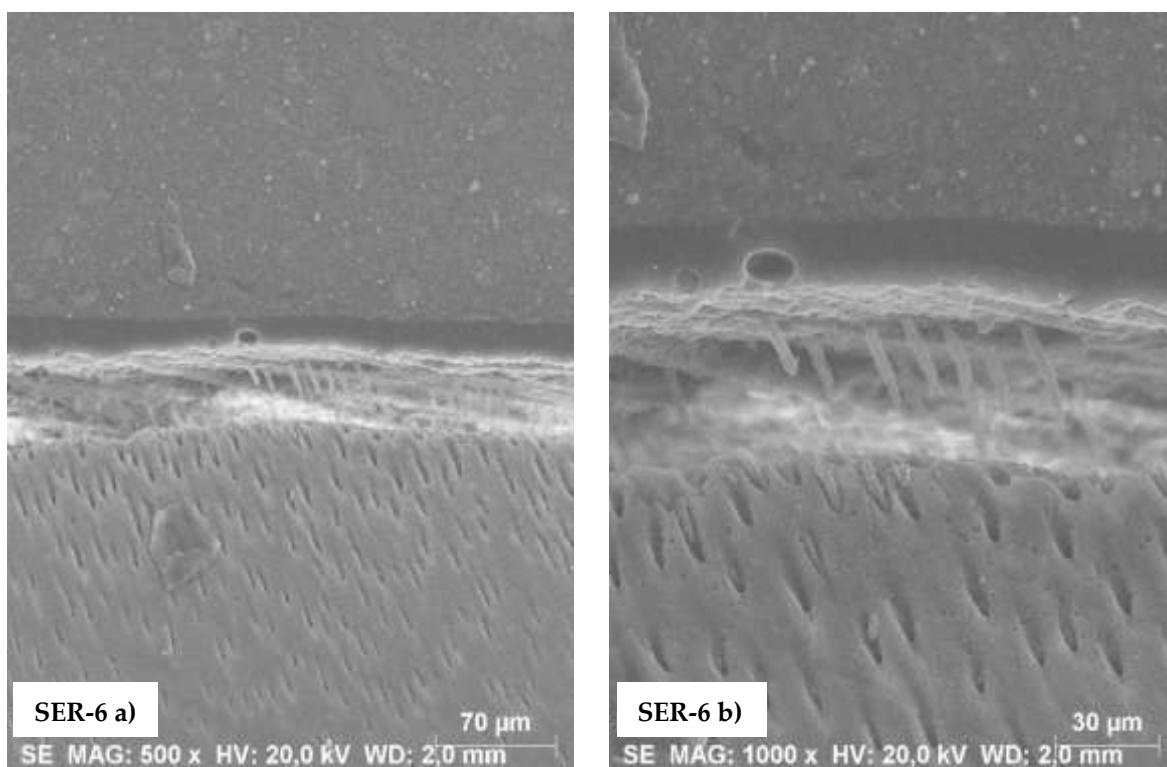
Figuras A.IV. 2 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo SSE-24 com ampliações a) 500x, b) 1000x, c) 5000x.



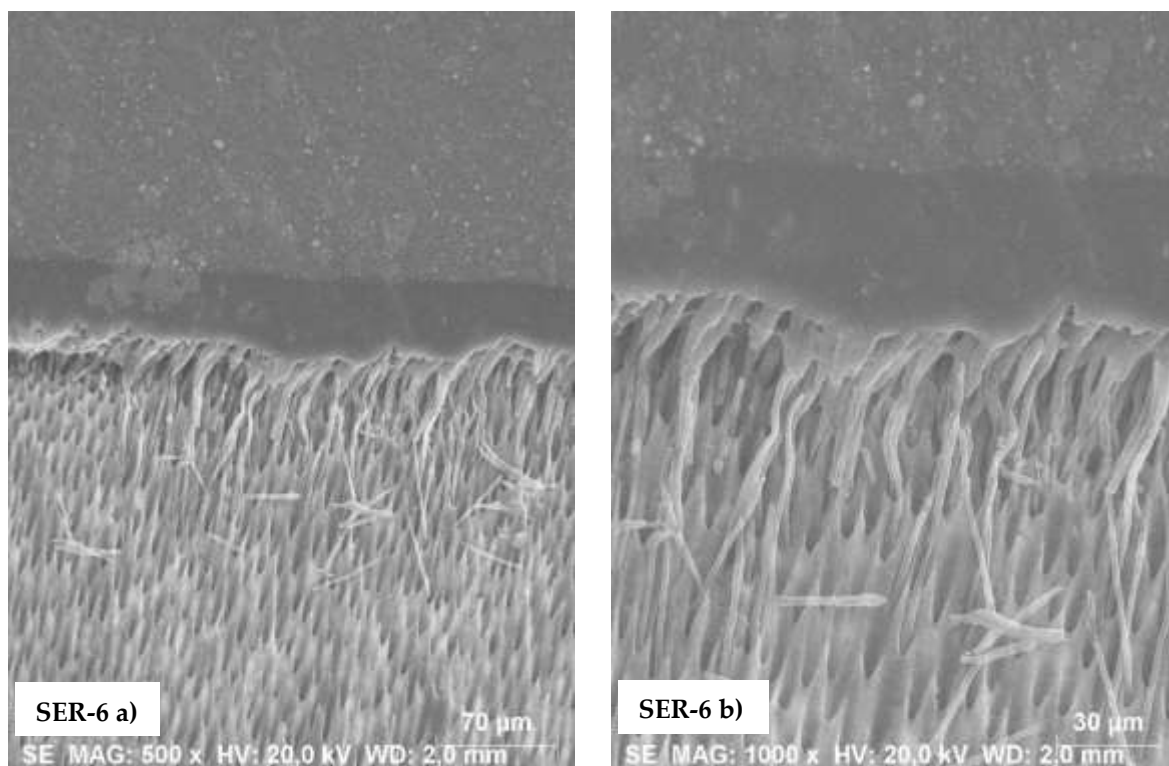
Figuras A.IV. 3 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo AER-24 com ampliações a) 500x, b) 1000x, c) 5000x.



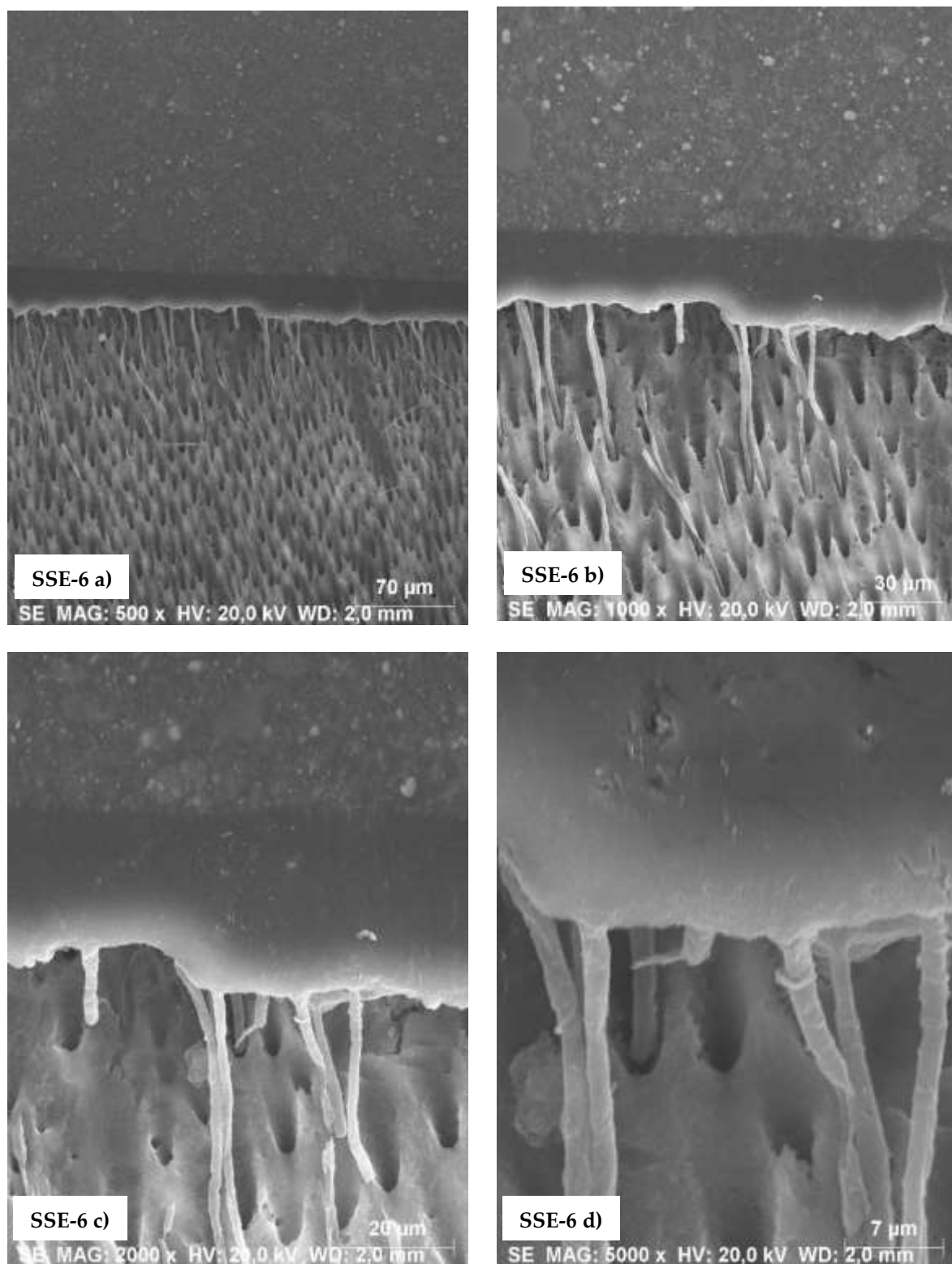
Figuras A.IV. 4 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo ASE-24 com ampliações a) 500x, b) 1000x, c) 5000x.



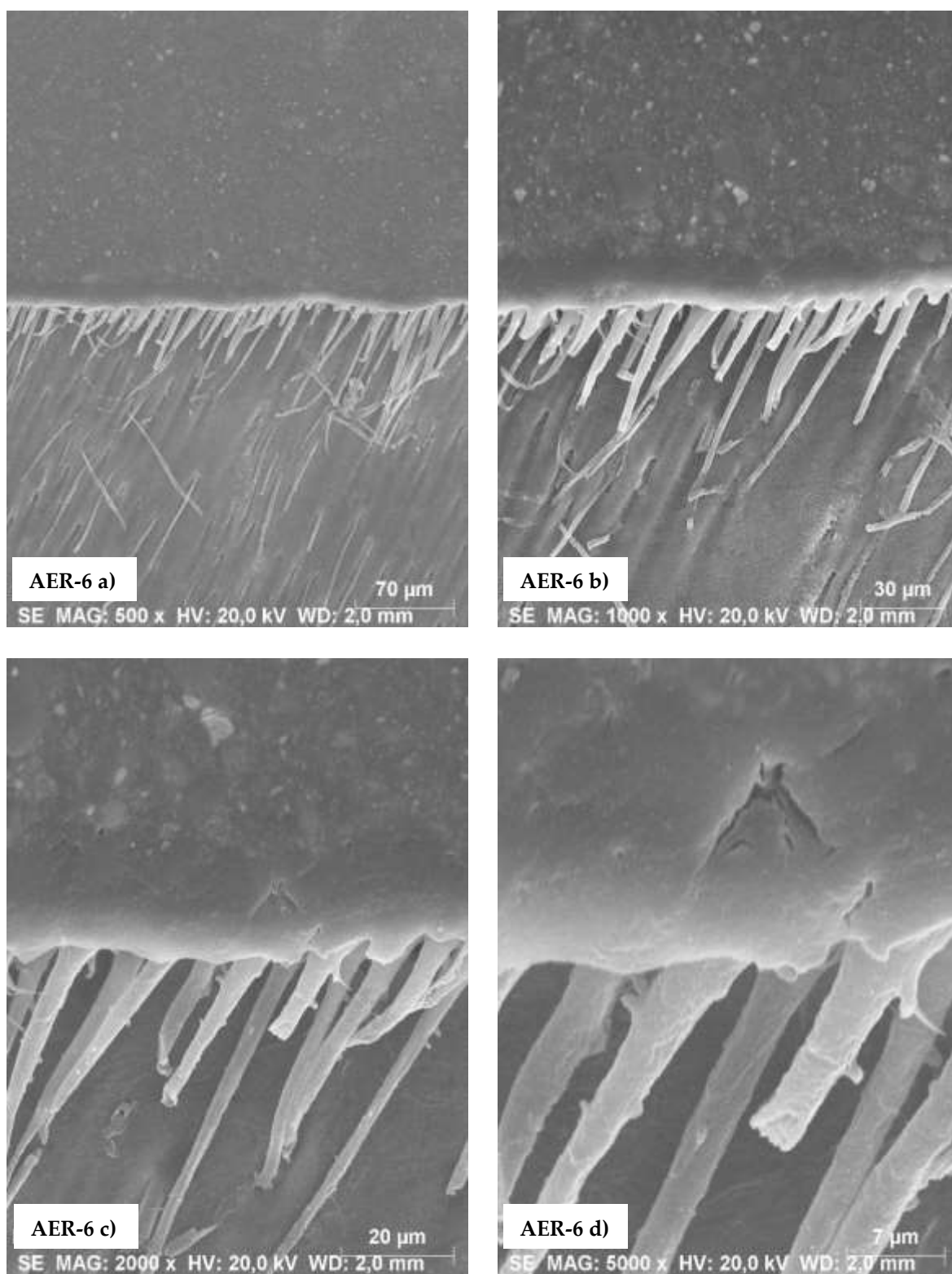
Figuras A.IV. 5 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo SER-6 com ampliações a) 500x, b) 1000x.



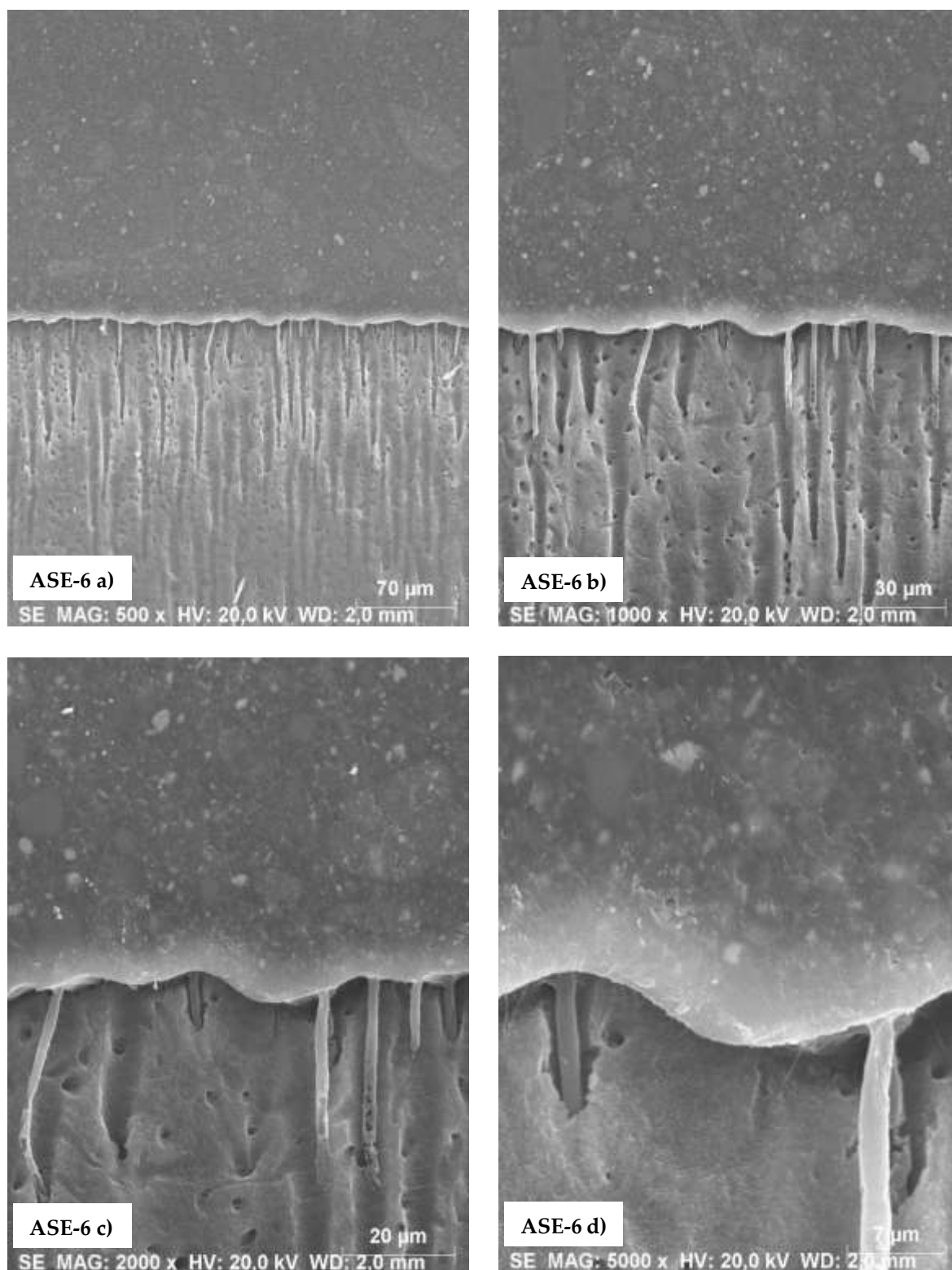
Figuras A.IV. 6 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo SER-6, mas num espécime diferente do anterior, com ampliações a) 500x, b) 1000x.



Figuras A.IV. 7 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo SSE-6 com ampliações a) 500x, b) 1000x, c) 2000x, d) 5000x.



Figuras A.IV. 8 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo AER-6 com ampliações a) 500x, b) 1000x, c) 2000x, d) 5000x.



Figuras A.IV. 9 – Fotografias das imagens obtidas por MEV para o grupo ASE-6 com ampliações a) 500x, b) 1000x, c) 2000x, d) 5000x.

Tabela A.V. 1 – Tabela do *output* obtido para o teste *U* de Mann-Whitney: estatísticas de teste para as variáveis *DC* e *DD*, face à variável de agrupamento “estratégia”.

Estatísticas de Teste ^a				
Substrato	Tempo		<i>DC</i>	<i>DD</i>
São	24H	U de Mann-Whitney	24,000	30,000
		Wilcoxon W	60,000	66,000
		Z	-1,422	-0,889
		Significância Assint. (Bilateral)	0,155	0,374
		Sig exata [2*(Sig. de unilateral)]	0,173^b	0,408^b
	6M	U de Mann-Whitney	37,000	18,000
		Wilcoxon W	115,00	96,000
		Z	-0,423	-2,028
		Significância Assint. (Bilateral)	0,672	0,043
		Sig exata [2*(Sig. de unilateral)]	0,711^b	0,045^b
Afetado	24H	U de Mann-Whitney	22,000	2,000
		Wilcoxon W	67,000	47,000
		Z	-0,067	-2,733
		Significância Assint. (Bilateral)	0,947	0,006
		Sig exata [2*(Sig. de unilateral)]	1,000^b	0,004^b
	6M	U de Mann-Whitney	54,000	14,000
		Wilcoxon W	132,00	92,000
		Z	-1,039	-3,349
		Significância Assint. (Bilateral)	0,299	0,001
		Sig exata [2*(Sig. de unilateral)]	0,319^b	0,001^b

a. Variável de Agrupamento: Estratégia

b. Não corrigido para empates.

Tabela A.V.2 – Tabela do *output* obtido para o teste *U* de Mann-Whitney: estatísticas descritivas para as variáveis *DC* e *DD*.

Estatísticas Descritivas								
Substrato	Tempo	Estratégia		N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
São	24 h	ER	DC	10	0,903	0,974	0,94697	0,020742
			DD	10	0,285	0,696	0,50584	0,116442
			N válido (listwise)		10			
		SE	DC	8	0,891	0,960	0,92894	0,026351
			DD	8	0,440	0,528	0,47622	0,030692
			N válido (listwise)		8			
	6 M	ER	DC	7	0,840	0,946	0,91444	0,035724
			DD	7	0,176	0,648	0,46466	0,163123
			N válido (listwise)		7			
		SE	DC	12	0,869	0,969	0,91178	0,031678
			DD	12	0,097	0,450	0,31334	0,101414
			N válido (listwise)		12			
Afetado	24 h	ER	DC	5	0,929	0,950	0,94050	0,008022
			DD	5	0,476	0,745	0,61199	0,100002
			N válido (listwise)		5			
		SE	DC	9	0,872	0,968	0,93502	0,030807
			DD	9	0,189	0,617	0,31067	0,136602
			N válido (listwise)		9			
	6 M	ER	DC	12	0,849	0,947	0,91084	0,033310
			DD	12	0,321	0,557	0,44976	0,083152
			N válido (listwise)		12			
		SE	DC	12	0,783	0,944	0,89597	0,046060
			DD	12	0,196	0,456	0,28587	0,090879
			N válido (listwise)		12			

Anexo VI

As respetivas incertezas dos valores apresentados nas tabelas seguintes foram calculados através da propagação das incertezas considerando uma incerteza no ajuste de 1%.

Tabela A.VI. 1 – Tabela com os valores obtidos para o grau de conversão [DC (%)] na camada híbrida, em dentinas sã e afetada, face às estratégias de aplicação do sistema adesivo (ER e SE), 24 h após o procedimento restaurador.

		DC (%)																	
		Dentina Sã								Dentina Afetada									
		ER				SE				ER				SE					
	L1	L2	L3	L4		L1	L2	L3	L4		L1	L2	L3	L4		L1	L2	L3	L4
Espécime 1	94±2	97±2	94±2		Espécime 4	97±2	96±2	96±2	95±2	Espécime 7					Espécime 10	96±2	96±2	95±2	
	93±2	94±2	93±2			95±2	96±2	96±2	91±2							95±2	96±2		
	93±2	93±2	81±2				93±2	95±2								92±2	90±2		
		91±2																	
Espécime 2	91±2	88±2	97±2		Espécime 5		98±2	98±2		Espécime 8		93±2	94±2		Espécime 11	94±2	91±2	94±2	
	86±2	90±2	27±2				96±2	97±2				95±2	96±2				89±2		
	89±2	89±2	86±2				89±2					95±2	94±2						
													94±2	91±2					
Espécime 3	96±2	95±2	93±2	94±2	Espécime 6		96±2	97±2		Espécime 9	97±2	95±2	93±2		Espécime 12	97±2	99±2	87±2	
	96±2	95±2	86±2	96±2			98±2	96±2			95±2	95±2	93±2				95±2		
	95±2	94±2	92±2	96±2							91±2		92±2						
	90±2			96±2									93±2						
	89±2			93±2															
				92±2															

Tabela A.VI. 2 – Tabela com os valores obtidos para o grau de desmineralização [DD (%)] desde o início da camada híbrida até ao fim da região desmineralizada pelo ácido, em dentinas sã e afetada, face às estratégias de aplicação do sistema adesivo (ER e SE), 24 h após o procedimento restaurador (CH identificada a sombreado).

DD (%)																			
Dentina Sã								Dentina Afetada											
ER				SE				ER				SE							
	L1	L2	L3	L4		L1	L2	L3	L4		L1	L2	L3	L4		L1	L2	L3	L4
Espécime 1	91±1	85±1	87±1	Espécime 4	87±1	90±1	93±1	94±1	Espécime 7	Espécime 10	82±1	90±1	73±1						
	76±1	81±1	81±1		73±1	35±1	92±1	80±1			73±1	85±1	31,7±0,4						
	41±1	76±1	62±1		22,6±0,3	9,6±0,1	76±1	23,8±0,3			57±1	51±1	7,3±0,1						
	21,2±0,3	55±1	35±1		4,7±0,1	4,0±0,1	30,7±0,4	0,84±0,01			37±1	20,4±0,3							
	5,4±0,1	22,6±0,3	7,4±0,1				8,6±0,1				17,6±0,3								
		12,5±0,1	3,6±0,1			0,44±0,01		11,2±0,2											
		2,92±0,04														2,99±0,04			
																0,290±0,004			
Espécime 2	90±1	89±1	89±1	Espécime 5		91±1	87±1	Espécime 8		Espécime 11	27,2±0,4	47±1	39±1						
	83±1	71±1	81±1		75±1	81±1	82±1		89±1		13,1±0,2	22,6±0,3	15,8±0,2						
	63±1	46±1	32±1		45±1	57±1	71±1		92±1			4,0±0,1	1,69±0,02						
	48±1	41±1	14,9±0,2		22,2±0,3	29,6±0,4	62±1		89±1										
	36±1	24,6±0,3	2,74±0,04		13,9±0,2	7,2±0,1	29,4±0,4		88±1										
	12,0±0,2				0,44±0,01	3,8±0,1		7,5±0,1	77±1										
					3,9±0,1				52±1										
					4,4±0,1				21,2±0,3										
					0,49±0,01														
Espécime 3	79±1	89±1	61±1	89±1	Espécime 6	94±1	90±1	Espécime 9	87±1	86±1	89±1	Espécime 12	50±1	75±1	41±1				
	75±1	90±1	52±1	83±1		92±1	84±1		87±1	79±1	86±1		13,8±0,2	47±1	5,6±0,1				
	76±1	66±1	45±1	79±1		73±1	63±1		79±1	30,8±0,4	74±1		1,34±0,02	20,8±0,3					
	62±1	34±1	50±1	77±1		41,4±0,6	47±1		66±1	37±1			6,1±0,1						
	59±1	12,1±0,2	37±1	70±1		15,2±0,2	40±1		50±1	25,5±0,4									
	43±1		10,7±0,2	51±1		4,0±0,1	29,4±0,4		44±1										
	22,5±0,3			30,9±0,4		2,07±0,03			32±1										
				23,8±0,3		2,34±0,03			19,9±0,3										
				7,2±0,1					7,4±0,1										
									4,8±0,1										

Tabela A.VI.3 – Tabela com os valores obtidos para o grau de conversão [DC (%)] na camada híbrida, em dentinas sã e afetada, face às estratégias de aplicação do sistema adesivo (ER e SE), 6 M após o procedimento restaurador.

		DC (%)															
		Dentina Sã								Dentina Afetada							
		ER				SE				ER				SE			
		L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4
Espécime 1	93±2					93±2	87±2	89±2	92±2	93±2	93±2	87±2	96±2	93±2	78±2	91±2	94±2
	90±2					80±2				87±2		92±2	94±2				
										83±2		93±2	94±2				
												92±2	92±2				
												90±2	89±2				
												92±2					
Espécime 2			91±2	91±2		95±2	87±2	93±2	92±2	87±2	95±2	90±2	96±2	91±2	87±2	91±2	90±2
						93±2					92±2	90±2	94±2	88±2			
												88±2	95±2				
												93±2	95±2				
												85±2	95±2				
Espécime 3	84±2	94±2	95±2	93±2		95±2	97±2	91±2	90±2	92±2	96±2	88±2	91±2	93±2	92±2	84±2	93±2
										94±2	93±2	83±2	90±2				
										95±2	92±2	84±2	84±2				
										96±2			94±2				
										94±2			92±2				
										97±2			94±2				

Tabela A.VI.4 – Tabela com os valores obtidos para o grau de desmineralização [*DD* (%)] desde o início da camada híbrida até ao fim da região desmineralizada pelo ácido, em dentinas sã e afetada, face às estratégias de aplicação do sistema adesivo (*ER* e *SE*), 6 M após o procedimento restaurador (CH identificada a sombreado).

		DD (%)															
		Dentina Sã								Dentina Afetada							
		ER				SE				ER				SE			
		L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4
Espécime 1	85±1					45±1	33,8±0,5	61±1	67±1	77±1	82±1	65±1	71±1	46±1	30,7±0,4	36±1	50±1
	66±1					19,9±0,3	13,9±0,2	48±1	51±1	63±1	18,3±0,3	53±1	57±1	19,9±0,3	8,5±0,1	8,3±0,1	21,1±0,3
	55±1					13,9±0,2		33±1	16,8±0,2	56±1		40±1	50±1	8,6±0,1			13,3±0,2
	49±1					4,1±0,1		18,2±0,3		34±1		22,3±0,3	34±1				5,0±0,1
	42±1							8,1±0,1		11,9±0,2		8,6±0,1	16,1±0,2				
	42±1											7,0±0,1					
29,8±0,4																	
Espécime 2			83±1	83±1		56±1	55±1	36±1	63±1	90±1	66±1	68±1	67±1	68±1	29,0±0,4	33±1	36±1
			58±1	40±1		55±1	11,4±0,2		48±1	50±1	38±1	56±1	54±1	36±1		21,1±0,3	21,5±0,3
			34±1	19,3±0,3		26,6±0,4			26,6±0,4	26,7±0,4	25,2±0,4	42±1	45±1	9,6±0,1		10,0±0,1	6,9±0,1
			13,7±0,2	3,9±0,1		6,5±0,1			13,1±0,2			32±1	44±1				
									3,9±0,1			24,6±0,3	45±1				
												11,4±0,1					
										3,4±0,1							
Espécime 3	42±1	82±1	90±1	82±1	66±1	78±1	46±1	15,5±0,2	85±1	83±1	74±1	70±1	41±1	83±1	64±1	67±1	
	8,5±0,1	70±1	63±1	48±1	11,8±0,2	9,1±0,1	24,5±0,3	3,9±0,1	75±1	73±1	37±1	45±1	8,2±0,1	54±1	45±1	23,7±0,3	
	1,86±0,03	53±1	26,9±0,4				2,96±0,04		66±1	54±1	18,2±0,3	25,0±0,4		25,4±0,4	25,0±0,4		
		34±1							58±1	29,9±0,4		26,7±0,4		12,2±0,2	13,8±0,2		
		12,4±0,2							48±1	6,4±0,1		24,0±0,3			6,7±0,1		
									27,8±0,4			35±1					
										27,5±0,4							

